Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A.Hirsch

ÜBER DEN EINFLUSS VON CLOMIPHEN UND TH 1165 a AUF DAS 3ß - OL - DEHYDROGENASE - DELTA 5 - DELTA 4 - ISOMERASESYSTEM DER MENSCHLICHEN PLAZENTA

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HELMUT RÖHNER
aus Marschalkenzimmern

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0003

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A.Hirsch

ÜBER DEN EINFLUSS VON CLOMIPHEN UND TH 1165 a AUF DAS 3ß - OL - DEHYDROGENASE - DELTA 5 - DELTA 4 - ISOMERASESYSTEM DER MENSCHLICHEN PLAZENTA

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HELMUT RÖHNER
aus Marschalkenzimmern

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. R. Lempp
1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. E. Schindler (Professor Dr. H. A. Hirsch)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Göbel

Druck: H.- J. Köhler - 7400 Tübingen - Neue Strasse 11

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Steroidstoffwechsel	1
1.2.	Verwendete Medikamente	16
1.2.1.	Clomiphen	16
1.2.2.	Th 1165 a	22
1.2.3.	Zyklisches AMP	30
2.	Untersuchungen	32
2.1.	Grundzüge der Untersuchungen	32
2.2.	Durchführung der Untersuchungen	32
2.2.1.	Material	33
2.2.1.1.	Lösungsmittel und Pufferlösungen	33
2.2.1.2.	Kristalline Steroide	33
2.2.1.3.	Radioaktive Steroide	33
2.2.1.4.	Messung der Radioaktivität	34
2.2.1.5.	Kieselgel und Kieselgur	34
2.2.1.6.	Medikamente	34
2.2.1.7.	Kurzgefaßte Anamnesen	35
2.2.2.	Vorbereitung der Versuche, Tabellen	46
2.2.3.	Präparation, Inkubation und Extraktion des Plazentagewebes	48
2.2.4.	Säulenchromatographie	49
2.2.5.	Isolierung und Identifizierung der Steroide	51
2.2.6.	Dünnschichtchromatographie	53
2.2.7.	Acetylierung der Steroide	57
2.2.8.	Kristallisation der Steroide	57
2.2.9.	Berechnung der Umwandlungsrate	58

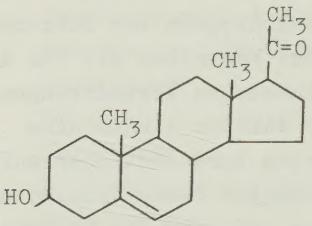
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Meßwerte der Versuche 1 - 17 und der Zusatzversuche 1 und 2	59
3.2.	Tabellen zu den Versuchen	72
3.2.1.	Vorversuche	72
3.2.2.	Kinetik (Zusatzversuch 1)	74
3.2.3.	Hauptversuche	75
3.3.	Erläuterung der Ergebnisse	79
3.3.1.	Vorversuche	79
3.3.2.	Kinetik	80
3.3.3.	Zusammenfassung der Vorversuche	80
3.3.4.	Folgerung für die Hauptversuche	81
3.4.	Hauptversuche	82
3.5.	Blankversuche und Untersuchungen zur Methode	82
3.6.	Statistik und Tabellen	83
3.7.	Zyklisches AMP	86
4.	Diskussion	87
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	98

1. EINLEITUNG

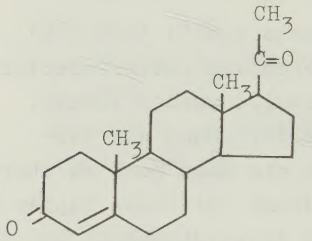
1.1. Steroidstoffwechsel

Im Jahre 1929 gewannen der Anatom G.W. Corner und der Gynäkologe W.M. Allen aus Gelbkörpern von Schlachttieren einen Extrakt, der bei Kaninchen die für die Corpus-Luteum-Phase kennzeichnenden Veränderungen des Endometriums hervorrief und darüber hinaus eine Schwangerschaft an kastrierten Versuchstieren aufrechterhalten konnte. Sie nannten diese Verbindung Progestin. Fünf Jahre später erfolgte die Strukturaufklärung und Synthese unter anderem durch die deutsche Forschergruppe Slotta, Butenandt und Fernholz.
Schon vier Jahre später konnte Mamoli 1938 (65) zeigen, daß dieses Progesteron von pulverisierter Hefe aus Pregnenolon hergestellt werden konnte.
Nach dieser Zeit nahm die Erforschung der verschiedensten Steroidhormone ein kaum noch zu überblickendes Ausmaß an. Der Grund für diese rapide Entwicklung der Aufdeckung von Steroidhormonen und ihrer Metabolisierungen lag vor allem an den ständig verbesserten Untersuchungsmethoden. Maßgeblich beteiligt waren daran Siiteri, P.K. 1963 (88), 1968 (89) und Schindler, A.E. 1968 (83). Vor allem die Anwendung einer Doppelisotopenmethode (89) ermöglichte eine verbesserte Identifizierung von Steroiden.
Pregnenolon und Progesteron sind Stoffe, die chemisch vom Pregnan abzuleiten sind.

Strukturformel von Pregnenolon und Progesteron



^{5} - Pregnenolon
(3ß-hydroxypregn-5-en-20-one)



Progesteron
(Pregn-4-ene-3,20 dione)

Beide Steroide sind sog. C_{21} - Steroide. Der chemische Unterschied besteht darin, daß Pregnenolon zwischen C_5 und C_6 eine Doppelbindung besitzt, die beim Progesteron zwischen C_4 und C_5 zu finden ist. Gleichzeitig findet bei der Synthese von Pregnenolon nach Progesteron noch eine Oxidation statt. Die Hydroxylgruppe des Pregnenolons am C_3 wird beim Progesteron in eine Ketogruppe umgewandelt. Die beiden für diese Umwandlung verantwortlichen Enzyme werden später genauer charakterisiert.

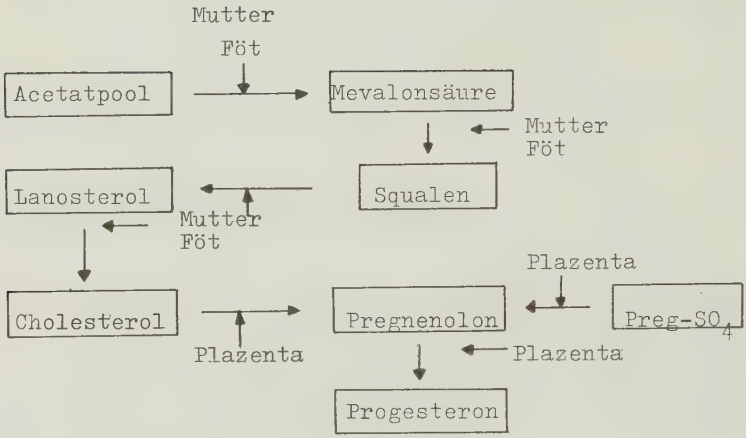
Da der Stoffwechselschritt vom Pregnenolon zum Progesteron eine zentrale Bedeutung für die Synthese von zahlreichen anderen Steroiden hat, war es immer wieder wissenschaftlich von großer Bedeutung, die Beeinflussung dieser Umwandlung durch verschiedenste Stoffe zu erforschen. Wie schon erwähnt, unterliegt das Progesteron vielen Metabolisierungsschritten. Seine Eliminierung erfolgt durch Inaktivierung in der Leber, wobei Wasserstoffatome in das Molekül eingeführt werden (98). Es entsteht so eine verschiedene Zahl von Isomeren, die schlechthin unter dem Begriff des Pregnandiol zusammengefasst werden. Das Pregnandiol wird an Glukuronsäure gekoppelt und im Urin ausgeschieden.
In den letzten drei Monaten der Schwangerschaft werden zum Beispiel 40 mg / die (42) nach einem anderen Autor 50 - 60 mg / die und mehr ausgeschieden (98).
Die Zahl der Organe in denen die Synthese von Pregnenolon nach Progesteron abläuft ist groß, so ist zum Beispiel während der Schwangerschaft das Maximum der Progesteronproduktion in den ersten vier Wochen im Corpus Luteum zu finden. Erst im Anschluß daran übernimmt dann die Plazenta die dominierende Rolle in der Synthese (91). Neben diesen Syntheseorten Corpus Luteum und Plazenta erfolgt auch in der Nebennierenrinde eine Bereitstellung von Progesteron das dann zu Kortikoiden und Androgenen weiter verstoffwechselt wird (17).
Genau so zahlreich wie die Orte der Progesteronbereitstellung sind die Möglichkeiten einer weiteren Verstoffwechslung des Hormons. Beispielsweise wird das in der Plazenta produzierte Progesteron im Föten hauptsächlich in Leber und Nebennierenrinde verstoffwechselt (114), wobei nach Untersuchungen von Bird C.E. et al. 1966 (12) in der Leber hauptsächlich eine 20α-Hydroxilierung zu 20α- Dihydroxyprogesteron stattfindet, während in der Nebennierenrinde von Föten die Progesteronmetaboliten Cortisol und Corticosteron nachgewiesen wurden (73b).

Dieselbe 20α-Hydroxilierung bestätigt Zander 1963 (116), gleichzeitig weist er noch auf einen regen Stoffwechsel zwischen Föt und Plazenta hin. Dieser rege Stoffwechsel wird später unter dem Begriff der Föto-Plazentaren Einheit näher erläutert.
Den für diese Synthese von Cortisol notwendigen Vorläufer, das 17α-OH Progesteron, wies Diczfalusy, E. 1969 (25) im Föten nach. Nach ihm stellt der Föt aus dem plazentaren Progesteron über das fötale 17a-OH Progesteron Cortisol her.
Eine 17α-Hydroxilierung an anderer Stelle, nämlich im Ovar, konnte von Axelrod et al. 1970 (2) nachgewiesen werden. Einen Stoffwechselweg der zu Östriol führt unter Umgehung der plazentaren Aromatisierung, wurde von Taylor, T. et al. 1974 (99) nachgewiesen.
Die Verstoffwechslung des Progesteron zu Östriol wurde von ihm (99) an Föten der 16. - 20. Woche untersucht. Nach der Perfussion mit ^{14}C - markiertem-Progesteron wurde vor allen Dingen aus der Leber Östriol isoliert. Dabei war aber bemerkenswert, daß Östradiol, Östron, Androstendion und Testosteron nirgends in größerer Menge isoliert werden konnten. Erstaunlicherweise fand sich jedoch eine Substanz, die als 16a-OH Progesteron identifiziert werden konnte. Es lag somit der Schluß nahe, daß der Föt aus Progesteron über 16α-OH Progesteron und anschließende Aromatisierung in der Leber unter Umgehung der plazentaren Aromatisierung direkt Östriol bilden konnte.
Nach diesem kurzen Überblick über einige andere mögliche Reaktionswege des Progesteron sei auf die spezielle Problematik des Stoffwechselweges vom Pregnenolon zum Progesteron und dessen weitere Metabolisierung während der Schwangerschaft eingegangen.
Wie eingangs schon erwähnt, war es den Entdeckern des sogenannten Progestins aufgefallen, daß dieser Stoff für die Erhaltung einer Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung ist.

Gutermann et al. 1953 (33) dokumentierten die Beziehung zwischen niedrigem Pregnandiolspiegel im Urin von Schwangeren und erhöhtem Abortrisiko. Jakobsen 1965 (48) und Gutermann 1953 (33) gelangten zu der gemeinsamen Erkenntnis, daß durch Progesterongaben die Abortrate eindeutig gesenkt werden konnte.
Auch Dicsfalusy 1960 weist in seiner Arbeit auf die Wichtigkeit des Progesterons für die Schwangerschaft hin (24).
Aus dieser Erkenntnis heraus wurde immer wieder versucht, aus dem Progesteronspiegel bzw. dessen Ausscheidungsprodukte Pregnandiol oder aus dem Ausscheidungsprodukt Östriol auf den Zustand des Föten schließen zu können. Einige ganz neue Parameter bei der Beurteilung des Funktionszustandes der Föto-Plazentaren Einheit fand Schindler, A.E. 1972 in seiner Arbeit über Steroide im Fruchtwasser (82). Er ging davon aus, daß nicht allein Östriol im Urin und Plasma der Mütter eine Aussage über den Zustand des Föten machen könnte, sondern daß vielmehr auch noch die Steroide des Fruchtwassers mit herangezogen werden sollten.
So konnte er nachweisen, daß bei Vorliegen einer schweren Erythroblastose der Östriolspiegel im mütterlichen Urin und Plasma durchaus normal sein kann, daß dagegen die Östriolkonzentration im Fruchtwasser erheblich absinkt. Gleichzeitig war es noch auffallend, daß bei schwerer Erythroblastose die 16α-Hydroxilierung erheblich vermindert ist, d.h. es wurden kaum meßbare C_{16}-oxidierte und C_{16}-hydroxilierte Steroide im Fruchtwasser gefunden. Dieselben Ergebnisse fand er bei Vorliegen einer Anenzephalie.
Diese Versuche, aus Steroidkonzentrationen auf den Zustand des Föten schließen zu können, macht es durchaus erklärbar, daß zahlreiche Untersuchungen über Steroidstoffwechselwege in der Plazenta durchgeführt wurden. Dabei ist der Schritt vom Pregnenolon zum Progesteron, der als Startreaktion anzusehen ist, schon immer von besonderem Interesse gewesen.

Daß die Plazenta während der Schwangerschaft dasjenige Organ ist, das, nachdem das Corpus Luteum in den ersten Schwangerschaftswochen Progesteron bildete, dessen Synthese fortsetzt, zeigten Solomon, S. et al. 1971 (91). Sie belegten diese Theorie dadurch, indem sie Pregnenolon in die Nabelvene injizierten und kurz darauf nur in der Plazenta Progesteron und 20α-Dihydroxyprogesteron isolieren konnten (92).
Palmer et al. 1966 (73a) zeigten ebenfalls, daß Pregnenolon nur in der Plazenta zu Progesteron verarbeitet wird, nicht dagegen im Föten. Sie schlossen jedoch nicht aus, daß ein Teil des Pregnenolon ohne metabolisiert zu werden, auf den Föten übergeht.
Lauritzen, C. et al. (58) berichten darüber, daß Neugeborene in den ersten drei Lebenstagen sinkende Mengen von Progesteron, 20α- und 20ß- Dihydroxyprogesteron ausscheiden, die aus der Plazenta stammen und nach deren Ausfall als Produktionsstätte absinken.
Harbert, G.M. et al. 1964 (38) untersuchten die Progesteronkonzentration in der Nabelvene und Nabelarterie. Dabei fanden sie in der Nabelarterie eine Konzentration von 44 ug/ 100 ml Plasma und in der Nabelvene 72 Ug / 100 ml Plasma. Auch Zander 1962, 1954 berichtet von einer höheren Progesteronkonzentration in der Nabelvene (115, 117).
Man kann daraus schließen, daß Progesteron in der Plazenta gebildet wird und von dort zum Föten gelangt. Diese Produktion von Progesteron in der Plazenta und den Transport zum Föten, der Progesteron benötigt und weiterverarbeitet, dokumentieren Dell Acqua, S. et al. 1967 (22) ebenfalls.
An Hand von Schwangerschaften mit reifen anencephalen Föten ließ sich zeigen, daß die Plazenta die Produktionsstätte für Progesteron sein muß (42). Mit einer Isotopenmethode wurde der Stoffwechsel des Cholesterols, einer Vorstufe des Progesterons, zu Progesteron untersucht.

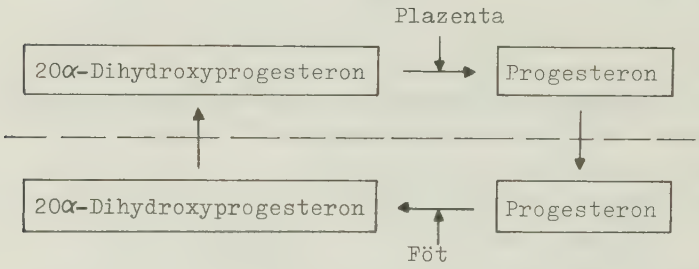
Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, daß in Schwangerschaften, in denen die fetale Nebennierenrinde ausfällt, im Grunde das gesamte Plazentaprogesteron aus maternem Plasmacholesterol gebildet wird. Dabei erschien es so, als sei die plazentare Progesteronproduktion unabhängig von der Anwesenheit des Föten. Gleichfalls konnte gezeigt werden, daß die plazentare Progesteronproduktion unabhängig ist von der Zufuhr von aus dem Blut stammenden Vorstufen der extraplazentaren endokrinen Organe (NNR, Ovarien). Gabbe, S. et al. 1971 (30) konnten zeigen, daß die Plazenta Pregnenolon ^{3}H zu 85% in Progesteron umwandelt.
Oben aufgeführte Arbeiten verschiedener Autoren belegen eindeutig, daß die Plazenta das Progesteronproduzierende Organ während der Schwangerschaft ist, darüber hinaus erscheint es nun notwendig, den genauen Syntheseort in der Plazenta und die Ausgangsmetaboliten des Stoffwechselschrittes vom Pregnenolon zum Progesteron darzustellen. Diczfalusy, E. 1970 (26) weist auf den Syncytiotrophoblasten als genauer lokalisierten Syntheseort für Progesteron in der Plazenta hin. Solomon, S. et al. 1971 (91) stützt diese Annahme, daß die Progesteronsynthese im Synzytiotrophoblasten stattfindet. Sie beginnt schon in der 3. - 6. Woche nach der Ovulation und nimmt immer den gleichen Weg. Dieser beginnt beim Acetat-Pool und läuft über Mevalonat, Squalen, zu Lanosterol und schließlich zum Cholesterol. Vom Cholesterol geht die Synthese zum Pregnenolon und zum Progesteron weiter. Von diesen Teilschritten kann die Plazenta nun nicht alle ausführen. Der folgende kurze Überblick gibt Auskunft über die von der Plazenta durchführbaren Syntheseteilschritte.



Aus Untersuchungen von van Leusden, H.A. et al. 1973 (59) geht hervor, daß bei Perfusion von Plazenten mit ^{14}C - markiertem Na-Acetat keine Vorstufen des Pregnenolon z.B. Squalen, Lanosterol oder Cholesterol gefunden wurden. Das heißt, die Plazenta besitzt nicht die Fähigkeit, alle Synthesestufen selber auszuführen, sondern ist vielmehr auf das Angebot von maternem Cholesterol angewiesen. Dieser Meinung schließen sich Telegdy, G. 1973 (100) und Hellig, H. et al. 1970 (42) an, wobei letzterer behauptet, daß mütterliches Cholesterol die größte, sehr wahrscheinlich auch die einzige Quelle für plazentares Progesteron ist.

Wie aus dem Schema zu ersehen ist, kann die Cholesterolsynthese aber auch vom Föten durchgeführt werden. Nach Marthur, R.S. et al. 1970 (67) synthetisiert der Föt Cholesterol nach van Leusden, H.A. et al. (59) Squalen und Lanosterol in größeren Mengen aus Acetat. Jedoch wird darauf hingewiesen, daß die Plazenta auch aus mütterlichem Blut Cholesterol bezieht. Dagegen sind Diczfalusy, E. 1969 (25) und Baird, D.T. et al. 1971 (4) der Meinung, daß das Cholesterol zur Pregnenolonsynthese mütterlichen Ursprungs sei.
Obige Ausführungen haben deutlich gezeigt, daß man bei der Betrachtung des Steroidstoffwechsels, was Syntheseorte und Syntheseteilschritte angeht, keinesfalls ein einheitliches, gut überschaubares Schema besitzt, sondern daß sich die Syntheseteilschritte auf ganz bestimmte Bezirke des Komplexes Mutter-Föt-Plazenta verteilen. Somit sind Föt und Plazenta inkomplette Funktionssysteme, die Steroide produzieren. Als Einheit ergänzen sie sich mit ihren verschiedenen Enzymsystemen, so daß die Föto-Plazentare Einheit als ein Organ angesehen werden kann, das in der Lage ist, alle wirksamen biologisch aktiven Steroide zu synthetisieren (26). Einen Kreislauf, der sich nur zwischen Föt und Plazenta abspielt, stellt die 20α-Hydroxilierung von Progesteron dar.
Palmer, R. et al. 1966 (73b) berichten, daß in der Plazenta 20α-Dihydroxyprogesteron in Progesteron umgewandelt (sog. Interconversion), im Föten dagegen Progesteron in 20α-Dihydroxyprogesteron umgewandelt wird.

Einen kurzen Überblick verschafft das folgende Schema:



Diesen Kreislauf des Progesteron zu 20α-Dihydroxyprogesteron in Föt und Plazenta untermauert auch Zander, J. 1963 (116), wobei er die 20α-Hydroxilierung in die fötale Leber lokalisiert, die sich nach Schumacher (85) auch in der Plazenta nachweisen ließ.

Es sei nun etwas über die Enzyme, die die Reaktion vom Pregnenolon zum Progesteron katalysieren berichtet:

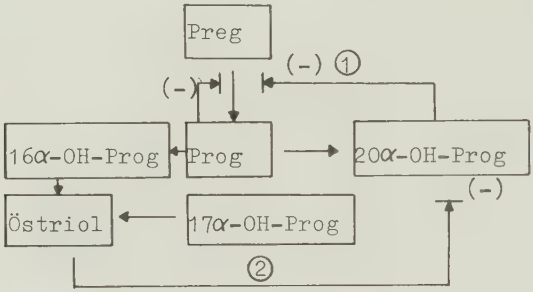
Wie eingangs schon unter den Abschnitt der Chemie des Stoffwechselschrittes Pregnenolon nach Progesteron erwähnt, wird eine Doppelbindung verschoben und ein Wasserstoffatom abgespalten. Diese beiden Reaktionen katalysierenden Enzyme sind eine Δ^5 - Isomerase und eine Δ^5 - 3ß - ol - Dehydrogenase. Den Nachweis, daß eine 3ß-ol-Dehydrogenase existiert, lieferten Baillie, A.H. et al. 1965 und Singh et al. 1969 (3, 87), ebenso Townsend, C. et al. 1970 (103), wobei Baillie die Dehydrogenase in den Syncitiophoblasten lokalisierte.

Cowan et al. 1974 (19) vermuten, basierend auf neueren Untersuchungen, daß das 3ß-ol-DHG-Δ5-Δ4- Isomerase-Enzymsystem nicht nur im glatten endoplasmatischen Retikulum zu finden ist, sondern auch in den Mitochondrien. Da die Enzymaktivität bei der Untersuchung von submitochondrialen Membranfraktionen hauptsächlich an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert werden konnte, ist eine eventuell bei der Herstellung der Fraktionen stattfindenen Kontamination jedoch nicht ausgeschlossen (19).
In der Plazenta von Kaninchen fand Matsumoto et al. 1969 (68) ebenfalls eine 3ß-ol-Dehydrogenase. Dabei stellte er noch überraschenderweise fest, daß dieses Enzym der Plazenta nur etwa 1/100 der Aktivität des Enzym im Ovar aufwies.
Daß die Aktivität der beiden Enzyme, wie die meisten anderen Enzyme, stark von exogenen Faktoren abhängig sind, konnten Koide, S.S. et al. 1965 (53) nachweisen. Er fand dabei das jeweilige pH-Optimum. Das der 3ß-ol-Dehydrogenase dürfte bei pH 10 - 10,5 liegen und dasjenige der Isomerase bei pH 7,0. Dabei ist die Feststellung, daß bei pH 7,0, also dem Optimum der Isomerase, keine Dehydrogenaseaktivität festzustellen ist, von besonderer Wichtigkeit, vor allen Dingen auch deshalb, weil der Bereich, in dem die Dehydrogenase nicht mehr aktiv ist, physiologischerweise viel schneller erreicht wird, als der Bereich der Inaktivität der Isomerase.
Betrachtet man die Aktivität beider Enzyme gemeinsam, indem man die Progesteronsyntheserate in Abhängigkeit des ph-Wertes untersucht, so erhält man nach Seifart, K.H. et al. 1968 (86) bei der lutealen Progesteronsynthese ein Maximum zwischen ph 7,3 und 7,4.

Inwieweit die Wirksamkeit der beiden Enzyme von der Regulation höherer Zentren abhängt, ist noch nicht sicher bekannt. Wiener, M. et al. 1971 (113) berichten zwar, daß die Hypophyse keinen Einfluß auf die Progesteronsyntheserate habe, jedoch konnte Jaffe 1967 (47) dies für die Cholesterolseitenkettenspaltung in Gonaden und Nebennieren nachweisen. Diese Seitenkettenspaltung des Cholesterols findet in den Mitochondrien aller steroidproduzierenden Organe statt, sie wird außerdem durch Hormone des Hypophysenvorderlappens in ihrer Reaktionsfolge spezifisch stimuliert. Dagegen sei zur Zeit noch kein Anhaltspunkt für eine vom Hypophysenvorderlappen gesteuerte Beeinflussung der Progesteronsyntheserate in der Plazenta von Primaten gegeben (34).
Neben der Möglichkeit der Beeinflussung der Enzyme durch übergeordnete Zentren ist die Kontrolle durch Stoffwechselprodukte, zum Beispiel im Sinne einer negativen Feed - Back Regulation, von nicht weniger Interesse.
Dell Acqua et al. 1967 (22) sprachen schon lange von einem relativen Mangel an 3ß-ol-Dehydrogenase beim Föten, der durch die Ergebnisse von Teller, W.M. 1970 (101) verständlich erscheint, obwohl dieser nur die Nebennierenrinde untersuchte. Er entdeckte, daß durch die plazentaren Hormone wie Progesteron und Östrogene die 3ß-ol-Dehydrogenase in der Nebennierenrinde des Föten gehemmt wird, so daß dieser unfähig ist, Progesteron selbst zu synthetisieren. Fällt dagegen nach der Geburt die Bremswirkung plazentarer Steroide weg, so ist der Weg für die eigene Steroidproduktion des Föten frei.
Eine Arbeit, die sehr genau diesen Bremsmechanismus untersuchte, lieferten Wiener, M. et al. 1968 (112). Sie berichteten, daß die Hemmung der 3ß-ol-Dehydrogenase nur durch spezifische Hemmstoffe möglich ist.

Die Art der Hemmung scheint nichtkompetitiv zu sein. Sie schlußfolgern daraus, daß die Steroidsyntheserate in der Plazenta durch Steroidmetaboliten kontrolliert wird, die Teile eines Feedback - Mechanismus sind. Der Hemmstoff muß eine ganz bestimmte chemische Konfiguration aufweisen, und zwar ist eine oxygene Komponente am C_{20} - Atom und eine Δ^4-3-Ketofunktion nötig (wie sie zum Beispiel beim Progesteron und beim 20α-OH-Progesteron vorkommt). Bei Untersuchungen mit Hemmstoffen, die eine Hydroxygruppe mehr besitzen, wie zum Beispiel 17α-OH-Progesteron oder 16α-OH-Progesteron, war festzustellen, daß beim 17α-OH-Progesteron die Hemmwirkung im Vergleich zum 20α-OH-Progesteron um 20% geringer war. 16α-OH-Progesteron selbst und seine analogen Verbindungen waren keine Hemmer der 3ß-ol-Dehydrogenase. Es konnte daraus geschlossen werden, daß die oxygene Komponente am C_{20}-Atom für die Bindung des Hemmstoffes an das Enzym verantwortlich ist und daß die Einführung von oxygenen Komponenten an benachbarte Atome, z.B. am C_{16} oder C_{17}, diese Bindung beeinflussen, so daß die Hemmwirkung reduziert wird. Die Arbeit von Wiener, M. et al. 1971 (113) beschäftigt sich im besonderen mit der Untersuchung der Hemmstoffe Progesteron und 20α-OH-Progesteron.
Beide Hormone scheinen in der Konzentration, wie sie in der Plazenta vorliegen, die 3ß-ol-Dehydrogenase auf nichtkompetitive Art zu hemmen.
Bei in vitro Versuchen schien die Hemmung mit 20α-OH-Progesteron nicht vom Alter der Plazenta abhängig zu sein, jedoch ist bei in vivo Verhältnissen die Progesteronproduktion und somit auch die 20α-OH-Progesteronkonzentration eindeutig vom Alter der Plazenta abhängig, d.h. in höherem Alter der Plazenta steht mehr Hemmstoff zur Verfügung.

Weiter konnte gezeigt werden, daß alle Östriolisomere und Östriol selbst die Bildung des Hemmstoffes 20α-OH-Progesteron unterdrücken. Zur besseren Übersicht dient nachfolgendes Schema



Preg = Pregnenolon
Prog = Progesteron
1) 20α-OH-Progesteron hemmt die 3ß- ol-Dehydrogenase
2) Östriol und seine Isomere hemmen die Synthese des 20α-OH-Progesterons.

Bei den Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit der 3ß-ol-Dehydrogenase in Abhängigkeit vom Alter der Plazenta wurden ebenfalls interessante Ergebnisse gewonnen. Es wurde das Enzym bei Spontanabort (22. Woche) und bei Plazenten, die am Termin durch Sectio gewonnen wurden, untersucht.
Es stellte sich heraus, daß bei Plazenten von Spontanaborten die Umsatzgeschwindigkeit der Pregnenolonmoleküle durch die 3ß-ol-Dehydrogenase stark verlangsamt war gegenüber termingerechten Plazenten und daß die Bildung des 20α-OH-Progesteron bei diesen Spontanaborten erhöht war.
Wenn man die Wirkung des 20α-OH-Progesterons mit Hilfe des oben aufgeführten Schemas vergleicht, ergibt sich für die sowieso schon wenig Progesteron produzierende

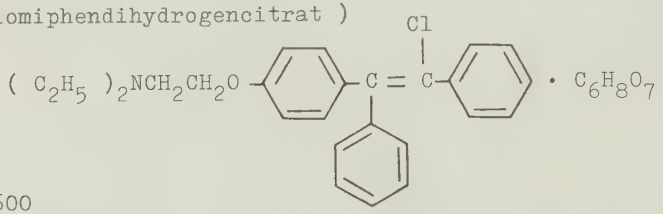
Plazenta ein Circulus vitiosus, da eben dieses 20a-OH-Progesteron die Progesteronsynthese noch mehr hemmt. Neben der Beeinflussung der Steroidsynthese selbst interessieren auch die Wirkungen von anderen Substanzen, unter anderem von Medikamenten.
Versuche dieser Art wurden von Little et al. 1959 (60) durchgeführt, er prüfte die Umwandlung von Progesteron in 20a-OH-Progesteron an Hand von Cofaktoren und fand dabei eine erhöhte Umwandlung.
Lurie, A.O. et al. 1966 (63) fand bei Verwendung von Clomiphen bei einer Patientin in der 10. Woche der Schwangerschaft einen Anstieg von Progesteron. Er vermutete, daß Clomiphen nur die Progesteronsynthese des Ovars stimulieren würde, nicht jedoch die der Plazenta. Welchen Einfluß die Medikamente Clomiphen (Dyneric^{R}) und Th 1165 a (Partusisten^{R}) auf die Progesteronsynthese der Plazenta ausüben, versucht diese Arbeit aufzuklären.

1.2. VERWENDETE MEDIKAMENTE

1.2.1. CLOMIPHEN (DYNERIC R)

Clomiphen, im Handel als DYNERIC R erhältlich, ist eine synthetische organische Verbindung ohne Steroidcharakter, die chemisch den östrogen wirkenden Stilbenderivaten verwandt ist.

Die Strukturformel von Clomiphen
(Clomiphendihydrogencitrat)



MG 600

Ursprünglich wollte Greenblatt 1961 (31) Clomiphen auf seinen etwaigen kontrazeptiven Effekt hin untersuchen. Er machte dabei die überraschende Feststellung, daß die Substanz bei vielen Frauen mit anovulatorischen Zyklen Ovulationen auslöste.

Daraufhin wurde in vielen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen versucht, den Wirkungsmechanismus des Clomiphens aufzudecken.

Diese sehr schwierige und komplexe Aufgabe veranlaßte Schulz, K.D. 1972 (84) noch zu der Äußerung, daß eine definitive Aussage über den Wirkungsmechanismus noch nicht gemacht werden könne, da sich vor allem zwischen tierexperimentellen und klinischen Versuchen eine erhebliche Diskrepanz fand (69).

Schulz, K.D. 1972 (84) konnte nachweisen, daß Clomiphen beim Menschen ovulationsauslösende bei Tieren hingegen eine ovulationshemmende Wirkung besitzt und daß überdies die spezieseigene Wirkung entscheidend von der angewandten Dosis abhängig sei. Trotz der oben genannten Unsicherheiten was Wirkungsort und Wirkungsmechanismus anging war es Schulz, K.D. der eine brauchbare Erklärung zur Wirkungsweise von

Clomiphen, über diese wird später noch berichtet, abgab.
Die Zeit nach der Entdeckung der ovulationsauslösenden Eigenschaften von Clomiphen war geprägt von Untersuchungen, die den eigentlichen Wirkungsort zeigen sollten.
Im wesentlichen wurde der Einfluß von Clomiphen auf die hypothalamisch - hypophysäre - ovarielle Achse untersucht. Die Untersuchungen erstreckten sich dabei sowohl auf die genannte Achse als Einheit, wie auch auf jedes ihrer Glieder. So fand Bettendorf, G. 1965 (10), daß für die Wirkung von Clomiphen eine intakte hypophysäre Funktion Voraussetzung sei. Er zeigte, daß nur bei eugonadotroper Ovarialinsuffizienz eine Clomiphentherapie sinnvoll sei. Diese Forderung wurde drei Jahre später dahingehend erweitert, daß neben einer funktionstüchtigen Hypophyse auch die Achse Hypothalamus - Hypophyse intakt sein müsse (11). Die notwendige Voraussetzung eugonadotroper Verhältnisse bei der Anwendung von Clomiphen untermauerten Heinrichs, H.D. und Zander, J. 1964 (41), gleichzeitig vermuteten sie, daß Clomiphen im Sinne eines Anstoßeffektes wirke, welcher die endogene Autoregulation des ovulatorischen Zyklus in Gang setze. Über die Achse Hypothalamus - Hypophyse hinausgehend bezog Taubert, H.D. 1967 (97) das Ovar mit in den Regelkreis ein, in welchem Clomiphen wirksam sein sollte.
Eine ähnliche Unsicherheit,wie sie bei der Suche nach dem eigentlichen Angriffsort auftrat, fand sich auch bei Betrachtung der Ergebnisse, die gewonnen wurden bei Verwendung verschiedener Konzentrationen von Clomiphen. Im Rattenorganismus beobachtete Mayer, H.G.K. 1971 (69) bei Verwendung verschiedener Konzentrationsstufen jeweils ganz verschiedene Wirkungen. Er fand in niedriger Dosierung Follikelreifung, Ovulation und Corpus-Luteum-Bildung.

Weitere Steigerung der Konzentration führte zu östrogenartigen Wirkungen am Vaginalepithel,um dann bei sehr hoher Dosierung in eine totale Hemmung der Ovarialfunktion überzugehen.
Versuche mit sehr hoher Dosierung führte auch Hammerstein, J. 1969 (36) durch. Er fügte zu jeweils 5 ml Inkubationsmedium mit menschlichem Corpora-Lutea Gewebe 1000 ug Clomiphen hinzu und erhielt dabei eine beträchtliche Verminderung der Progesteronbildung aus markiertem Azetat.
Schulz, K.D. 1972 (84) bemühte sich, wie weiter vorne schon angedeutet, die konzentrations-abhängigen Wirkungen in Verbindung mit dem Wirkungsort bei der Frau zu erklären und fasste seine gewonnenen Ergebnisse folgendermaßen zusammen:
Die östrogenen bzw. antiöstrogenen Wirkungen im Organismus der Frau werden durch zwei Faktoren bestimmt, nämlich durch die absolute Konzentration am Wirkungsort und durch die quantitative Relation zwischen Clomiphen und endogenen Östrogenen. Dadurch wird es verständlich, daß Clomiphen, je nachdem in welcher Dosierung es appliziert wird, auf die Achse Hypothalamus - Hypophyse - Ovar verschieden wirken kann. Bei der Frau wären folgende Mechanismen somit denkbar:
Im niedrigen Dosierungsbereich kann Clomiphen auf Grund seiner sehr viel geringeren Affinität zu östrogenen Rezeptoren nicht mit den natürlichen Östrogenen um diese Bindungsorte in östrogenabhängigen Organen konkurrieren, d.h. es findet hier in diesem Bereich keine Beeinflussung statt. Bei Steigerung der Dosierung werden dann die Rezeptoren für natürliche Östrogene in Hypothalamus und Hypophyse durch Clomiphen besetzt, als dessen Folge eine Erhöhung des Gonadotropinreleaserspiegels und der Gonadotropine selbst mit der gewünschten Stimulierung der Ovarialfunktion auftritt.

Anwendung sehr hoher Konzentrationen führt schließlich zu vollständiger Blockade der östrogensensitiven Rezeptoren. Gleichzeitig aber steigert sich die primär geringe östrogene Wirksamkeit und bewirkt wie natürliche Östrogene eine Hemmung des Gonadotropin-releasers und der Gonadotropine selbst. Der ovulationsauslösende Effekt von Clomiphen kehrt sich in einen ovulationshemmenden um. Dieser von Schulz, K.D. entwickelte Wirkungsmechanismus wirkt sehr überzeugend. Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß er das Ergebnis von vielen sich auch zum Teil widersprechenden Versuchsresultaten war. Im folgenden wird ein kurzer Überblick gegeben über Versuche, die dazu dienen sollten, den Wirkungsmechanismus von Clomiphen zu verdeutlichen. Man kann diese Versuche einteilen nach dem jeweiligen Angriffsort in der Achse Hypothalamus - Hypophyse - Ovar.

1. Wirkung von Clomiphen auf den Hypothalamus
2. Wirkung von Clomiphen auf die Hypophyse mit anschließendem Anstieg der Gonadotropine bzw. Fehlen dieses Anstieges.
3. Wirkung von Clomiphen auf das Ovar und dessen Enzymsystem.

Daß eine direkte Wirkung auf den Hypothalamus bestand, zeigten Igarashi, M. et al. 1967 (46), indem sie bei Ratten Clomiphen direkt in die Eminentia mediana und den vorderen Hypothalamus injizierten. Es resultierte daraus eine Zunahme von Plasma- und Hypophysen-LH, eine erhöhte FSH - Ausschüttung, aber keine erhöhte FSH - Synthese, also lediglich ein FSH - Ausstoßeffekt. Bettendorf, G. et al. 1968 (11) berichteten, daß die Wirkungsweise des Clomiphens auf einer Verdrängung der natürlichen Östrogene von ihren Rezeptoren im Hypothalamus und der Hypophyse beruhe, so daß die antigonadotrope Wirkung der Östrogene herabgesetzt sei, also der Eindruck eines relativen Östrogen-

mangels entsteht. Dieser Vorstellung einer Blockierung der östrogensensitiven Chemorezeptoren im Hypothalamus mit anschließendem Gonadotropinanstieg schlossen sich auch Riley, G.M. 1964 (76) und Taubert, H.D. 1971 (97) auf Grund ihrer Ergebnisse an.
Zahlreich sind die Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung von Clomiphen auf die Hypophyse beschäftigten. Eine der interessantesten Untersuchungen wurde von Kato, Y. et al. 1968 (52) vorgenommen. Bei Versuchen an Ratten zeigte sich, daß Clomiphen die Aufnahme von Östradiol durch die Hypophyse und den Hypothalamus unterdrückt. Dabei sind für eine Blockade des Hypothalamus hundertmal höhere Dosen nötig als für die der Hypophyse. Das würde bedeuten, daß Clomiphen besonders leicht die Östradiolbindungsrezeptoren in der Hypophyse blockieren kann. Eine Hemmung der Wirkung der endogenen Östrogene auf die Hypophyse mit nachfolgendem Anstieg der Gonadotropine nehmen auch andere Autoren an (102, 90).
Keine Steigerung der Gonadotropinsekretion fanden Charles, D. 1963 (18), Loraine, Y.A. 1964 (62) und Smith, O.W. 1963 (90), wobei letzterer nach Clomiphenapplikation eine vermehrte Östrogenausscheidung aus dem Ovar feststellte. Auch die Anwendung von Clomiphen bei Männern ließ einen Gonadotropinanstieg vermissen (39).
Die Wirkung von Clomiphen auf das Ovar scheint darin zu bestehen, daß bestimmte Enzymsysteme im Steroidstoffwechsel beeinflußt werden (9), was dann zu nachfolgendem Anstieg der Östrogene führt (18, 90). Ob dieser Anstieg durch eine Potenzierung der Wirkung der Gonadotropine oder durch einen direkten Eingriff von Clomiphen in die Steroidgenese des Ovars geschieht, kann nach Smith et al. 1963 (90) nicht sicher entschieden werden. Neben einer Erhöhung nur der Östrogene fanden Hammerstein, J. 1967 (35) und

Robertson, D.M. 1971 (78) eine Erhöhung der Östrogene und der Pregnandiolausscheidung unter Clomiphenanwendung.
Die oben aufgeführten Ergebnisse überblickend kann man feststellen, daß Clomiphen wahrscheinlich an jeder Stelle der Achse Hypothalamus - Hypophyse - Ovar eingreifen kann.
Es scheint sich also nicht nur um eine kompetitive Hemmung der Östrogenrezeptoren in Hypothalamus oder Hypophyse zu handeln, sondern es drängt sich auch die Vermutung auf, daß eine Einflußnahme von Clomiphen in der Peripherie des Regelkreises stattfindet. Diese Einflußnahme besteht nach Daume, E. et al. 1974 (20) in einer Erhöhung der Aromatisierung im Ovar, die überdies hinaus auch von Adelung, K. 1976 (1) festgestellt wurde.

1.2.2. TH 1165 a (PARTUSISTEN^{R})

Trotz Intensivierung der Schwangerenfürsorge und der Einrichtung von Intensivpflegestationen zur Aufzucht von gefährdeten Neugeborenen konnte die perinatale Mortalität der Frühgeborenen in den letzten Jahren nicht wesentlich gesenkt werden (93). Der hohe Frühgeburtenanteil von 60 - 80% an der perinatalen Sterblichkeit (14) und insbesondere an den zerebralen Spätschäden macht die intensiven Bemühungen verständlich, die Gefahr einer vorzeitig endenden Schwangerschaft durch geeignete Maßnahmen zu bannen.
Während die Zervixschlußinsuffizienz durch Zerklage einer Behandlung zugängig geworden ist, stand der Geburtshelfer der vorzeitigen Wehentätigkeit aus anderen Ursachen bisher weitgehend machtlos gegenüber.
Wenn also die perinatale Sterblichkeit der Kinder vermindert werden sollte, so galt es vor allem, die Frühgeburten zu verhindern.
Die Ursache, welche letztlich zur Frühgeburt führt, läßt sich nur in etwa der Hälfte aller Fälle eindeutig eruieren, dagegen ist das Symptom, die koordinierten Kontraktionen der Gebärmutter, einheitlich.
Aus dieser Unsicherheit heraus, was die Ursache der Frühgeburt angeht, wurden viele Versuche mit den verschiedensten Substanzgruppen unternommen, diese vorzeitig einsetzenden Kontraktionen zu verhindern.
Die Versuche liefen in der Richtung, eine Substanz zu finden, die bei geringen maternen und fetalen Nebenwirkungen eine effektive Ruhigstellung des vorzeitig wehentätigen Uterus bewirkt.

Therapeutische Anwendung bei vorzeitiger Wehentätigkeit fanden bisher

1. Verlassene Wehenhemmer
   a) Progesteron
   b) Spasmolytika
   c) Diazepine

2. Gasförmige Wehenhemmer
   a) Halothan
   b) Äther

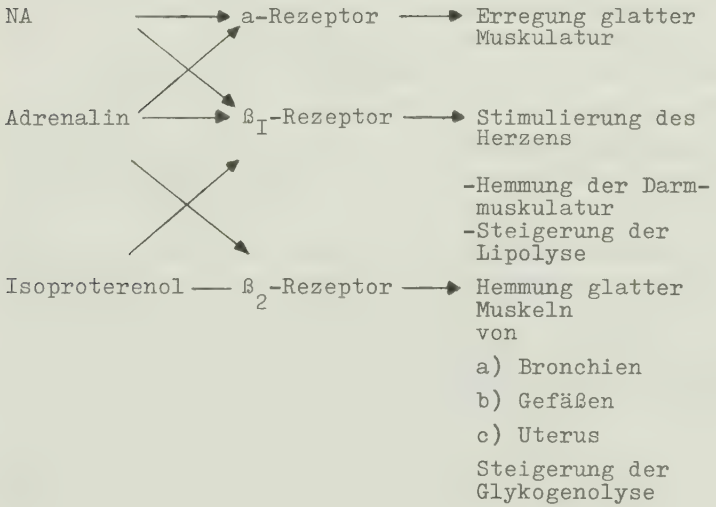
3. Äthanol

4. ß - Mimetika

Kurz einige Bemerkungen über die vermutete Wirkungsweise der einzelnen Substanzgruppen.
Die frühere Annahme, Progesteron wäre ein Oxytozinantagonist, mußte verlassen werden, seit Mosler (70) gezeigt hat, daß sogar die zwanzigfache Progesteronblutplasmakonzentration den Uterus nicht wehenhemmend beeinflußt, daß sogar darüber hinaus Progesteron in physiologischen Dosen einen Anstieg von Kontraktionsstärke und Frequenz des Uterus verursacht.
Vielleicht resultiert die Wirkungslosigkeit des exogen zugeführten Progesteron daraus, daß das Progesteron keine ausreichende Konzentration am Erfolgsorgan selber erzielen konnte, da es zum größten Teil im Fettgewebe deponiert wurde, oder es lag an der festgestellten sehr kurzen Halbwertszeit von zwei Minuten (70).

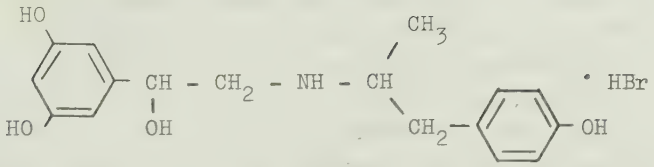
Mosler (70) kam zu dem Ergebnis, daß Progesteron und Oxytocin in physiologisch vorkommenden Konzentrationen einen additiven Effekt haben und daß erst eine nur im Experiment anwendbare, niemals physiologischerweise vorkommende Konzentration die Uteruskontraktionen hemmt. Dieser Effekt ist wohl als Blockade der elektrischen Erregungsleitung zu sehen. Jedoch läßt Mosler (70) offen, daß Progesteron möglicherweise doch noch über einen pharmakologischen Langzeiteffekt wirkungsvoll ist, der vom akuten pharmakologischen Effekt zu trennen ist. Dieser pharmakologische Langzeiteffekt könnte darin bestehen, daß nicht nur die Progesteronkonzentration allein wichtig ist, sondern das Verhältnis Östrogene / Progesteron die entscheidende Rolle spielt. Wie Jung (51) feststellte, läßt sich durch die Veränderung des Verhältnisses Östrogene / Progesteron die Sensibilität der ß - Rezeptoren verändern. So kommt es bei einer Vergrößerung des Quotienten, das heißt bei einem Progesteronabfall zu einer Aktivitätszunahme des Uterus.
Die als Spasmolytika verwendeten Substanzen leiteten sich aus der Reihe der Opiumalkaloide und ihrer Derivate ab. Es sind dies unter anderem Morphin, Papaverin und Dolantin. Papaverin soll in hoher Dosierung, nach Mosler (70) wehenhemmend sein, wobei der Angriffspunkt direkt an der glatten Muskelzelle liegt.
Nach Hüter (45) sollen die Ergebnisse der Wehenhemmung mit Opiumalkaloiden sehr unbefriedigend sein, er berichtet sogar, daß zum Beispiel Dolantin über einen bisher noch unbekannten Wirkungsmechanismus eine hypophysäre Oxytocin- und ADH - Ausschüttung bewirkt.
Über die Wirksamkeit der Präparate der Diazepine wird berichtet, daß eine eingefahrene Wehentätigkeit, welche Verstreichen der Zervix und Dilatation des Muttermundes bewirkt, mit diesen Substanzen nicht zu unterdrücken

ist (15, 13, 44, 43).
Die Anwendung der gasförmigen Wehenhemmer wurde verlassen und nur noch für spezielle Komplikationen während der Geburt (Nabelschnurvorfall, verschleppte Querlage) angewendet.
Über die Anwendung von Äthanol als Tokolytikum berichtete Fuchs (28, 29). Als Wirkungsmechanismus wird eine Hemmung der Oxytocinausschüttung angenommen.
Nachdem die zuvor aufgeführten Medikamente als Tokolytikum doch größtenteils versagten, ruhten die ganzen Hoffnungen der Geburtshilfe auf der raschen Entwicklung der sogenannten ß - adrenergen Sympathikomimetika.
Die moderne Pharmakologie postulierte schon lange verschiedene Rezeptoren am vegetativen System, über die die Wirkung von Medikamenten ablaufen sollte.
Hierzu ein Schema:



Die ß-sympathikomimetischen Substanzen entfalten ihre Wirkung über eine Stimulierung der postulierten ß-Rezeptoren am glatten Muskel. Dies gilt sowohl für Herz und Kreislauf als auch für die Uterusmuskulatur.
Durch die Abwandlung der chemischen Struktur von ß-sympathikomimetischen Substanzen war es dann möglich, die Wirkungsschwerpunkte zugunsten des Angriffs auf die $ß_2$-Rezeptoren des Uterus zu verschieben. Es konnte aber nie ganz vermieden werden, daß nicht doch geringe Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, im Sinne einer positiven chronotropen, inotropen und dromotropen Wirkung und einer peripheren Vasodilatation, auftraten, besonders dann nicht, wenn sehr hohe Dosen von ß-Sympathikomimetika zur Ruhigstellung nötig waren.
Weidinger, H. et al. (108) fanden dann, daß die Nebenwirkung von ß-Stimulatoren auf das Herz durch Gabe von Calciumantagonisten (Isoptin) aufgehoben werden konnte, daß sie darüber hinaus sogar am Uterus synergistisch mit den ß-Sympathikomimetika wirkten.
Wie aus obigem Schema zu ersehen ist, wirkt Isoproterenol (Aludrin^R) auf ß-Rezeptoren. Von dieser Substanz ausgehend, die wegen ihrer raschen oxydativen Zerstörung ungünstig war, kam man zu stabileren, länger wirkenden Substanzen unter anderem dem Orciprenalin (Alupent^R).
Aus der Weiterentwicklung des Orciprenalins entstand dann das Th 1165 a (Partusisten^R).
TH 1165 a ist chemisch das Hydrobromid des 3,5-Dihydroxyalpha-1-1-(p-hydroxy-alpha-methyl-phenyläthyl) amino-1-methyl-1-benzyl Alkohols.

Seine Strukturformel



Summenformel: $C_{17}H_{22}NO_4Br$

Molekulargewicht: 384

Die heute für die Anwendung von TH 1165 a geltenden Indikationen sind:

1. vorzeitig einsetzende Wehen bei drohender Frühgeburt bis zur 37. - 38. Woche und bei Abortus imminens ab der 16. Schwangerschaftswoche.
2. Ruhigstellung des Uterus bei operativen Eingriffen am graviden Uterus.
3. bei Dystokien in der Eröffnungs- und Austreibungsperiode.
4. zur Vorbereitung geburtshilflicher Operationen und von Kaiserschnitten.
5. bei Nabelschnurvorfall.

Kontraindikationen bilden Thyreotoxikose, tachykarde Herzrhythmusstörungen, idiopathische hypertrophe subvalvuläre Aortenstenose und intrauterine Infektionen. Über die Auswirkungen auf den Föten wird berichtet, daß bei kombinierter Gabe von Th 1165 a und Isoptin^{R} die Herzfrequenz praktisch unverändert blieb (108). Von einer, allerdings nur leichten, fetalen Tachykardie berichten Hüter, J. et al., Maiss, Ch. et al. und Mosler, K.H. et al. (45, 64, 72). Ansonsten wurden von Weidinger, H. et al. (110) keine schädigenden Einflüsse auf den Föten festgestellt.

Durch die tokolytische Behandlung kann als Nebenwirkung bei der Mutter eine Steigerung der Herzfrequenz (51, 56b, 71, 107, 93) Blutdruckabfall, insbesondere des diastolischen Drucks, auftreten.
Infolge der glykogenolytischen Wirkung steigt der Blutzucker nach Unbehaun et al.(107)an. An weiteren Nebenwirkungen werden Herzklopfen, Unruhe, Übelkeit, Schwitzen, Tremor und Brechreiz bemerkt (74).
Noch einige Bemerkungen zur Pharmakologie und Pharmakokinetik von Th 1165 a.
Th 1165 a zeigt nach Streller, I. (94) eine hohe Affinität zu Rezeptoren des Uterus. Am Herzen wirkt es positiv chrono-, ino- und dromotrop. Die Herzkranzgefäße werden erweitert, ebenso die Arterien der Peripherie. Trotz einer Zunahme der Förderleistung des Herzens kann es infolge Senkung des peripheren Widerstandes zu einem Blutdruckabfall kommen.
Auf die Muskulatur der Bronchien wirkt Th 1165 a bronchospasmolytisch, dagegen ist die Wirkung auf die Darmmuskulatur nach Engelhardt, A. et al. gering (27). Zur Pharmakokinetik wird berichtet, daß Th 1165 a bei oraler Gabe rasch aus dem Darm resorbiert wird und das Blutspiegelmaximum bereits nach 2 Stunden erreicht ist. Zur Ausscheidung (es wurde über keine Akkumulation in Organen berichtet) kommt Th 1165 a durch Leber und Nieren.
Die Resorptionsquoten betragen nach Buchelt, L. et al. (16) und Rominger, K.L. et al. beim Hund 85% und beim Mensch 60% (79).
Bei Embryotoxizitäts- (Ratten, Mäuse), Teratogenitäts- (Ratten, Kaninchen), Fertilitäts- (Ratten), und Perinataluntersuchungen (Ratten) ergaben sich keine Anhaltspunkte für substanzbedingte Schädigungen (74).
Künzel, W. et al. (566) beobachteten unter Th 1165 a - Infusion eine Zunahme der O_2-Sättigung im fetalen Blut, die wahrscheinlich durch eine verbesserte uteropla-

zentaren Durchblutung erklärt werden könnte.
Die Einflüsse auf den Stoffwechsel der Mutter sind vor allem glykogenolytischer Art, das heißt, es kommt zu einem Anstieg des Blutzuckers (51, 57, 106, 109). Unbehaun et al. (106) wiesen zudem noch nach Applikation von Th 1165 a einen Anstieg der Insulinkonzentration nach, darüber hinaus fanden sie vermehrt Laktat, Acetessigsäure und ß-Hydroxybuttersäure. Dabei waren die Konzentrationen der untersuchten Parameter 1 Stunde nach Infusionsbeginn höher als nach 4 Stunden.
Nicht zuletzt wegen der geringen Auswirkungen auf den Stoffwechsel wird Th 1165 a heute an vielen geburtshilflichen Stationen erfolgreich bei obigen Indikationen angewandt. Fötale Hypoxie ist nach Künzel, W. et al. (56a) allein durch eine tokolytische Behandlung und dabei auftretender verbesserter Sauerstoffsituation zu bekämpfen.
Die Sauerstoffverbesserung ist wahrscheinlich über eine intensivere uteroplazentare Durchblutung infolge Muskelrelaxation zu erklären. Darüber hinaus berichteten Weidinger, H. et al. (108) und Hüter, J. et al. (45), daß Neugeborene von Müttern mit Wehenhemmung in einem besseren Zustand geboren werden als Kinder von Müttern, denen keine ß-sympathikomimetischen Substanzen gegeben wurden.

1.2.3. ZYKLISCHES AMP

Das zyklische AMP (= Adenosin-3',5'-monophosphat) wurde 1957 unter anderen von Sutherland und Rall entdeckt. Es wird in der Zelle aus ATP mit Hilfe der Adenylzyklase gebildet. Dieses zyklisierende Enzym scheint hauptsächlich in der Zellmembran und im Zellkern lokalisiert zu sein. Es nimmt an der Zellmembran das Signal des "first messengers" (=Hormon) auf und gibt der Zelle Signale weiter, d.h. die Adenylzyklase wandelt das initiale extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres um, indem es die Konzentration des zyklischen AMPs erhöht. Sutherland et al. fanden in der Leberzelle eine Konzentration von 10^{-5}molar und in der Nebenniere von 10^{-3}molar (96a).
Das zyklische AMP, der "second messenger", aktiviert seinerseits intrazelluläre Enzyme, z.B. die Leberphophorylase, die Triglyzeridlipase und die saure Phosphatase.
Hormone, die über die Vermittlung des zyklischen AMP in den Stoffwechsel eingreifen, sind u.a. folgende: Glukagon, ACTH, Katecholamine, Vasopressin, Gonadotropine, Angiotensin, MSH, Serotonin, Östrogene, Prostaglandine, STH, Parathormon (49).
Bald schon wurde erkannt, daß ACTH über den Mechanismus der Phosphorylaseaktivierung, die dadurch ausgelöste Glykogenolyse und den nachfolgenden Glukoseabbau schließlich durch Bereitstellung von NADPH die Steroidgenese in der Nebennierenrinde fördert (95, 40).
Das intrazelluläre zyklische AMP wird durch das Enzym Phophodiesterase durch Ringsprengung zu 5'-AMP abgebaut und somit inaktiviert (96b). Diese Reaktion ist von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig und kann durch das Purinderivat Theophyllin (=1,3-Dimethyl-Xanthin) gehemmt werden. Die Wirkung des Theophyllins wird seinerseits wieder durch Dinitrophenol inhibiert (7).

Das oft experimentell verwendete synthetische Derivat des zyklischen AMP, das Dibutyryl-zykl.-AMP, besitzt den Vorteil, daß es erstens besser in die Zelle eindringt und zweitens widerstandsfähiger gegen die Hydrolyse durch die Diesterase erscheint.
Den Einfluß des zyklischen AMPs auf die Progesteronsynthese haben mehrere Autoren an Geweben verschiedener Tierspezies (77, 66, 55) sowie Bedwani in invitro Versuchen mit menschlicher Plazenta untersucht (8).

2. UNTERSUCHUNGEN

2.1. GRUNDZÜGE DER UNTERSUCHUNGEN

Wegen ihrer leichten Zugänglichkeit und ihres ausgeprägten Steroidstoffwechsels bietet sich die Plazenta für experimentelle Untersuchungen an, zumal kein Unterschied zwischen unreifen und termingerechten Plazenten bezüglich der Kontinuität ihres Metabolismus besteht (30).
In der vorliegenden Arbeit wurde am Gewebe der termingerechten Plazenta der Einfluß des Ovulationsauslösers Clomiphen (DYNERIC^{R}), des Tokolytikums Th 1165 a (PARTUSISTEN^{R}) und von 3',5'- zyklischem AMP auf den Metabolismus von Pregnenolon und Progesteron untersucht.
Auf die Zugabe von Kofaktoren oder Sauerstoff zur Inkubation sowie auf die Abtrennung von Mikrosomenfraktionen vom plazentaren Gewebshomogenat wurde verzichtet.

2.2. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN

Insgesamt wurden 19 Versuche mit der Doppelisotopenmethode durchgeführt (88, 89, 82, 83), bei denen jeweils Gewebe von einer Plazenta verwendet wurde.
Die Versuche 1 - 7 dienten der Auffindung der günstigsten Dosierung der verwendeten Pharmaka. Im Zusatzversuch 1 wurde eine kinetische Studie zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit durchgeführt.
Die Versuche 8 - 17 sind als Hauptversuche anzusehen, die dann auch der statistischen Auswertung zugrunde liegen. Schließlich wurde im Zusatzversuch 2 die Wirkung des zyklischen AMPs untersucht.
In den Versuchen 3 und 15 wurde jeweils ein Blankversuch ohne Gewebe durchgeführt, um etwaige nichtenzymatische Veränderungen der radioaktiven Steroide feststellen zu können. Ein doppelter Kontrollansatz in Versuch 16 und

ein Versuch (bei Versuch 17), bei dem die Inkubation sofort abgestoppt wurde, dienten der weiteren methodischen Absicherung.

2.2.1. MATERIAL

2.2.1.1. Lösungsmittel und Pufferlösung

Alle Lösungsmittel wurden von der Firma Merck AG (Darmstadt) bezogen und waren von analytischer Qualität. Die Phosphatpufferlösung (einmolar, pH 7,4) stammte aus der Universitätsapotheke Tübingen.

2.2.1.2. Kristalline Steroide

Folgende Standardsteroide kamen zur Anwendung (Trivialnamen und Abkürzungen). Sie wurden in kristalliner Form und gelöst in Methanol verwendet:
Progesteron (Prog)
Pregnenolonacetat (Preg)
Alle Steroide waren von Steraloid, Inc., Pawling, N.Y.

2.2.1.3. Radioaktive Steroide

Die radioaktiven Steroide wurden vom Radiochemical Center Amersham bezogen. Sie wurden vor Gebrauch durch Säulenchromatographie gereinigt und anschließend in Methanol gelöst. Die radioaktiven Hormone wurden vor dem Gebrauch mittels einer Celitesäule (20 g) mit den Fließmitteln:
1. 50 ml Isooctan
2. 100 ml Isooctan : 100 ml Gemisch Isooctan / Äthylacetat 7 : 3
gereinigt. Das genauere Vorgehen wird im Kapitel der Säulenchromatographie genauer erläutert.
Radioaktivität der einzelnen Hormone.
Progesteron - 7 - ^{3}H, spez. Aktivität 50,3 Ci / mM.
Pregnenolon - 4 - ^{14}C, spez. Aktivität 51,0 mCi / mM.

2.2.1.4. Messung der Radioaktivität
Die Messung der Radioaktivität wurde im Flüssigkeits-szintillationsspektrometer der Firma Packard, Modell 3380 mit einem Absolute Activity Analyser Modell 544 vorgenommen. Die Proben wurden in verschließbare Plastikgefäße gefüllt und in der Szintillationsflüssigkeit gelöst. Die Lokalisation der radioaktiven Steroide auf den Dünnschichtchromatographieplatten erfolgte mit Hilfe des Scanners 11 (LB 2723) der Firma Berthold.
Szintillationsflüssigkeit: 960 ml Toluol wurden mit 40 ml Permafluor 25x der Firma Packard gemischt.

2.2.1.5. Kieselgel und Kieselgur
Das Kieselgel G (nach Stahl, Typ 60) stammte von der Firma Merck AG, Darmstadt.
Es wurde Kieselgur Nr. 545 der Firma Johns-Manville benutzt, das zuvor in einer Glassäule für zwölf Stunden mit 6 n HCL durchtränkt wurde. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen bis die Spülflüssigkeit einen neutralen pH-Wert erreichte. Danach wurde nacheinander mit destilliertem Wasser, Methanol und zuletzt mit Diäthyläther gespült.

2.2.1.6. Medikamente
Clomiphen (DYNERIC^{R})
Lot 18 Code 7037
R. Merrell Gross Gerau

Th 1165 a • HBr (PARTUSISTEN^{R})
Charge Nr. XII

2.2.1.7. kurzgefaßte Anamnesen

Die Placenten erhielten wir von Patientinnen, deren kurzgefaßte Anamnesen nachfolgend aufgeführt sind.

Die aufgeführten Zahlen beinhalten folgende Angaben:

1. Name der Patientin, Journalnummer
2. Geburtstag der Patientin
3. Zahl der bisherigen Schwangerschaften
4. Frühere Geburten
5. Blutgruppe der Mutter
6. errechneter Termin und Geburtstermin
7. Art der Geburt und Lage des Kindes

Angaben zum Kind

8. Geschlecht
9. Gewicht
10. Länge
11. Apgar und Blutgruppe des Kindes
12. Dauer der Geburt

Angaben zur Plazenta

13. Maße der Plazenta
14. Gewicht der Plazenta
15. Nabelschnurangaben
    a) Ansatz
    b) Länge
    c) Durchmesser
16. Besonderheiten der Plazenta und des Geburtsverlaufs

Versuch 1

1.) E.N., JN 649 (73)
2.) 20.11.53
3.) I.- para
4.) -
5.) AB Rh +
6.) ET 03. 07. 73, GT 02. 07. 73
7.) Sectio infolge Beckenmißverhältnis
2. Beckenendlage und 2. Steißlage

8.) männlich
9.) 3280 g
10.) 49 cm
11.) Apgar 9
12.) Sectio, Dauer 32 min.
13.) 22/17/2 cm
14.) 570 g
15.) lateral
57/2 cm
16.) -

Versuch 2

1.) M.E. JN 735 1973
2.) 07. 08. 40
3.) I.- para
4.) -
5.) A Rh negativ
6.) ET 28. 07. 73, GT 29. 07. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) weiblich
9.) 3270 g
10.) 49 cm
11.) Apgar 5, nach 5 min. Apgar 9
A Rh +
12.) 9 Std.
13.) 20/19/2 cm
14.) 500 g
15.) lateral
51/1,5 cm
16.) reichlich Kalkspritzer, vorzeitiger Blasensprung, grünes Fruchtwasser, Anti - D - Prophylaxe, Anaemie

Versuch 3

1.) S.Th., JN 890/1973
2.) 06.11.54
3.) II. - para
4.) 1971 Spontangeburt, männlich, 50 cm, 3160 g
5.) 0 Rh +
6.) ET 13. 09. 73, GT 11. 09. 73
7.) spontan aus I. HHl

8.) männlich
9.) 3120 g
10.) 50 cm
11.) Apgar 9
12.) 8 Std. 54 min.
13.) 19 / 15 / 1,5 cm
14.) 490 g
15.) 55 / 1 cm
16.) Übertragungszeichen +

Versuch 4

1.) H.T., JN 342 PP 1973
2.) 21.10.46
3.) I. - para
4.) -
5.) 0 Rh +
6.) ET 27. - 29. 09. 73, GT 28. 09. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) weiblich
9.) 3820 g
10.) 52 cm
11.) Apgar 9
12.) 8 Std. 2 min.
13.) 20 / 15 / 1 cm
14.) 500 g
15.) lateral
55/1,5 cm
16.) leichte Übertragungszeichen des Kindes

Versuch 5

1.) T.H. JN 378 PP 1973
2.) 16.06.39
3.) I. - para
4.) -
5.) A Rh +
6.) ET 22. - 25. 10. 73, GT 22. 10. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) weiblich
9.) 3160 g
10.) 49 cm
11.) Apgar 10
12.) 2 Std. 25 min.
13.) 23 / 27 / 2 cm
14.) 600 g
15.) lateral
45 / 1,5 cm
16.) -

Versuch 6

1.) L.A., JN 1042 1973
2.) 29.07.49
3.) III. - para
4.) 1970 Spontangeburt, männlich, 51 cm, 3250 g
1972 Spontangeburt, weiblich, 47 cm, 2680 g
5.) A Rh negativ
6.) ET 25. 10. 73, GT 23. 10. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) männlich
9.) 3040 g
10.) 50 cm
11.) Apgar 10, Blutgruppe AB Rh +
12.) 30 min.
13.) 17 / 15 / 3 cm
14.) 590 g
15.) 50 / 2 cm
16.) Anti - D - Prophylaxe

Versuch 7

1.) V.E., JN 1065 1973
2.) 29.10.51
3.) I. - para
4.) -
5.) A Rh negativ
6.) ET 21. 11. 73, GT 30. 10. 73
7.) Sectio bei 1. Steißlage in der 38. Woche

8.) männlich
9.) 2100 g
10.) 45 cm
11.) Apgar 2 nach 5 min. Apgar 6, B Rh +
12.) -
13.) 20 / 17 / 1 cm
14.) 560 g
15.) 60 / 1,5 cm
16.) Kalkinfarkte

Versuch 8

1.) S. A.-M., JN 1154 1973
2.) 19.12.53
3.) I. - para
4.) -
5.) A Rh negativ
6.) ET 16. 12. 73, GT 23. 11. 73
7.) Einleitung, I. HHL

8.) männlich
9.) 3160 g
10.) Apgar 5 nach 5 min. Apgar 9
11.) 4 Std. 34 min.
12.) 48 cm
13.) 18 / 17 / 2 cm
14.) 400 g
15.) 70 / 1 cm, lateral
16.) Anti - D - Prophylaxe

Versuch 9

1.) N.A., JN 422 PP 1973
2.) 23.10.41
3.) I. - para
4.) 1970 Abortus incompletus
5.) 0 Rh +
6.) ET 02. 12. 73, GT 27. 11. 73
7.) spontan aus II. HHL

8.) männlich
9.) 3500 g
10.) 52 cm
11.) Apgar 10
12.) 2 Std. 21 min.
13.) 18 / 18 / 2 cm
14.) 490 g
15.) 55 / 1,5 cm, median
16.) -
17.) -

Versuch 10

1.) K.A., JN 1197 1973
2.) 01.04.1939
3.) III. - para
4.) 1964 Spontangeburt, männlich, 54 cm, 4000 g
1966 Spontangeburt, weiblich, 53 cm, 3500 g
5.) B Rh negativ
6.) ET 09. 12. 73, GT 05, 12. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) weiblich
9.) 3730 g
10.) 52 cm
11.) Apgar 9
12.) 11 Std.
13.) 22 / 20 / 2,5 cm
14.) 610 g
15.) marginal
70 / 1,5 cm
16.) Anti - D - Prophylaxe

Versuch 11

1.) M.R., JN 1209 · 1973
2.) 30.04.49
3.) III. - para
4.) 1968 2. nasoant. Stirnlage mit sek. Wehenschwäche
männlich, 2830 g, 46 cm
1971, spontan, weiblich, 3440 g, 53 cm
5.) A Rh +
6.) ET 03. - 07. 12. 73, GT 07. 12. 73
7.) spontan aus I. HHL

8.) weiblich
9.) 3320 g
10.) 49 cm
11.) Apgar 10
12.) 3 Std. 40 min.
13.) 15 / 17 / 2 cm
14.) 520 g
15.) 50 / 1,5 cm Lateral
16.) -

Versuch 12

1.) Sch.A., JN 1251 1973
2.) 09.11.42
3.) I. - para
4.) -
5.) 0 Rh +
6.) ET 14. 12. 73, GT 20. 12. 73
7.) Sectio bei II. Schädellage

8.) männlich
9.) 3430 g
10.) 50 cm
11.) Apgar 8
12.) -
13.) 19,5 / 18 / 2 cm
14.) 630 g
15.) lateral
49 / 1,3 cm
16.) Nebenplazenta 10 / 7 / 1,5 cm
Sterilitätsbehandlung mit Dyneric, grünes
Fruchtwasser

Versuch 13

1.) K.A., JN 9 1974
2.) 23.01.40
3.) I. - para
4.) -
5.) 0 Rh +
6.) ET 08. 01. 74, GT 04. 01. 74
7.) spontan aus HHL

8.) weiblich
9.) 3600 g
10.) 50 cm
11.) Apgar 9
12.) 12 Std. 50 min.
13.) 19 / 15 / 2 cm
14.) 440 g
15.) lateral
60 / 1,5 cm
16.) zwei Infarkte in der Plazenta 1,5 x 1,5 cm

Versuch 14

1.) Ö.G., JN 21 1974
2.) 29.02.38
3.) IV. - para
4.) frühere Geburten I. 1956, o.B.
II. 1958, o.B.
III. 1962, o.B.
5.) A Rh +
6.) ET 09. - 15. 01. 74, GT 08. 01. 74
7.) spontan aus I. HHL, Dammriß

8.) männlich
9.) 3550 g
10.) 50 cm
11.) Apgar 9
12.) 6 Std. 4 min.
13.) 17 / 16 / 1,5 cm
14.) 400 g
15.) 70 / 1 cm, lateral
16.) -

Versuch 15

1.) Sch.G., JN 27 1974
2.) 07.02.40
3.) I. - para
4.) -
5.) O Rh negativ
6.) ET 29. - 31. 12. 73, GT 10. 01. 74
7.) spontan aus II. HHL

8.) männlich
9.) 4310 g
10.) 53 cm
11.) Apgar 9, A Rh +
12.) 9 Std. 58 min.
13.) 21 / 19 / 1,5 cm
14.) 560 g
15.) lateral
47 / 1,5 cm
16.) Wehenmitteltropf, pH Nabelschnurarterie: 7,345
Östriol 3 Tage vor der Geburt: 45,2 mg / 24 Std.

Versuch 16

1.) E.E., JN 98 1974
2.) 02.08.39
3.) II. - para
4.) 1. Kind 1968, 3700 g, 54 cm, o.B.
5.) O Rh +
6.) ET 03. 02. - 10. 02. 74, GT 29. 01. 74
7.) spontan aus I. HHL

8.) männlich
9.) 3300 g
10.) 52 cm
11.) Apgar 9
12.) 4 Std. 44 min.
13.) 19 / 15 / 2 cm
14.) 460 g
15.) lateral
63 / 1,5 cm
16.) -

Versuch 17

1.) K.G., JN 37 PP 1974
2.) 11.12.43
3.) I. - para
4.) -
5.) 0 Rh +
6.) ET 11. 01. 74, GT 31. 01. 74
7.) spontan aus I. HHL

8.) männlich
9.) 4140 g
10.) 53 cm
11.) Apgar 10
12.) 9 Std. 10 min.
13.) 25 / 19 / 2 cm
14.) 510 g
15.) lateral
70 / 1 cm
16.) Nabelschnurknoten, Kalkspritzerinfarkte in der Plazenta, kleine Nebenplazenta

Zusatzversuch 1

1.) R.E., JN 1016 1973
2.) 06. 09. 41
3.) III. - para
4.) 1962 Abort ?
    1962 Kind männlich, 52 cm, 3500 g
    1972 Kind weiblich, 50 cm, 3000 g
5.) B Rh +
6.) ET 15. 10. 1973, GT 15. 10. 1973
7.) Sektio bei Querlage und Armvorfall

8.) weiblich
9.) 3350 g
10.) 52 cm
11.) Apgar 6, nach 5 min. Apgar 8
12.) -
13.) 23/19/1 cm
14.) 760 g
15.) 60/1 cm
16.) Vor der Sektio wurde Th 1165 a gegeben

Zusatzversuch 2

1.) K.I., JN 672 1974
2.) 05. 05. 50
3.) I. - para
4.) -
5.) 0 Rh negativ
6.) ET 15. - 29. 07. 74, GT 15. 07. 74
7.) spontan aus II. HHL

8.) weiblich
9.) 2200 g
10.) 45 cm
11.) Apgar nach 1 min. 8, nach 5 min. 10
    0 Rh negativ
12.) 6 Std. 5 min.
13.) -
14.) 320 g
15.) 65/1 cm
16.) Kind zeigte Übertrgungszeichen

2.2.2. Vorbereitung der Versuche

Für jeden Ansatz eines Versuchs wurde radioaktives Progesteron (ca. 1,8 Mill. dpm) und radioaktives Pregnenolon (ca. 1,1 Mill. dpm) gelöst in Methanol, verwendet. Die absolut zugesetzte Menge in ml ergab sich jeweils durch Umrechnung unter Berücksichtigung der jeweiligen Aktivität der verwendeten radioaktiven Substanzen.
Die radioaktiven Substanzen Pregnenolon und Progesteron wurden in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Unter Stickstoffventilation wurde der Erlenmeyerkolben eingetrocknet. Nach Eintrocknung wurden 10 ml Äthylacetat zugegeben. Davon wurden aus jedem Erlenmeyerkolben 0,1 ml entnommen, in ein Plastikgefäß gefüllt, eingetrocknet und bei 3 ^{o}C aufbewahrt. Das Verhältnis der darin sich befindenden radioaktiven Substanzen Pregnenolon und Progesteron (Verhältnis $^{3}H/^{14}C$ bzw. $^{14}C/^{3}H$) bildeten die Grundlage zur Bestimmung der Umwandlungsrate, worauf an anderer Stelle noch näher eingegangen wird. Die im Erlenmeyerkolben verbliebenen restlichen 9,9 ml wurden wieder unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Anschließend wurden die Medikamente in ihrer jeweiligen Konzentration zugegeben (s. Tabelle 1 u. 2).

Konzentrationen von Clomiphen

Tab. 1

Molarität	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	$5\cdot10^{-5}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	$5\cdot10^{-2}$
V_1								
V_2								
V_3								
V_4								
$V_5 - V_7$								
$V_8 - V_{12}$								
$V_{13} - V_{17}$								

$V_1 - V_7$ Vorversuche

$V_8 - V_{17}$ Hauptversuche

Konzentrationen von Th 1165 a

Tab. 2

Molarität	10^{-10}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	$5\cdot10^{-5}$	10^{-3}	10^{-2}	$5\cdot10^{-2}$
V_2								
V_3								
$V_4 - V_7$								
$V_8 - V_{12}$								
$V_{13} - V_{17}$								

$V_2 - V_7$ Vorversuche

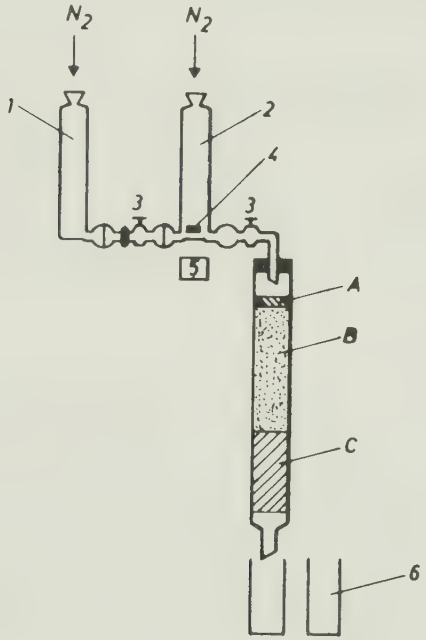
$V_8 - V_{17}$ Hauptversuche

2.2.3. Präparation, Inkubation und Extraktion des Plazentagewebes

Aus der meist kurz zuvor geborenen Plazenta wurden Gewebsstücke entnommen und für jeden Ansatz jeweils 1 g Gewebe abgewogen. Anschließend wurde ca. eine Minute bei 4000 U/min. homogenisiert. Dabei wurde zum Schutz vor Überwärmung gekühlter Phosphatpuffer zugesetzt.
Zu dem Homogenat wurde anschließend soviel Phosphatpuffer zugesetzt, daß auf 1 g Plazenta jeweils 10 ml Phosphatpuffer entfielen.
In die vorbereiteten Erlenmeyerkolben wurde nun jeweils 10 ml dieses Homogenats gegeben und sofort mit der Inkubation bei 37 ^{o}C im Schüttelinkubator unter Luftzutritt begonnen (über Dauer der Inkubationen siehe unter Ergebnisse).
Die Inkubation wurde durch Hinzugabe von 50 ml Äthylacetat beendet. Die Extraktion der Steroide erfolgte im Schütteltrichter durch Schütteln für jeweils fünf Minuten. Die obere Fraktion wurde in Rundkolben aufgefangen, während die untere Phase, das Inkubat, noch jeweils zweimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt wurde.
Der gesammelte Überstand (extrahierte Steroide) wurde unter Vakuum eingetrocknet, anschließend mit Äthylacetat in kleine Glasgefäße übertragen und wiederum unter Stickstoff eingetrocknet.

2.2.4. Säulenchromatographie

Die Isolierung der Steroide wurde mit der Gradientenelutionschromatographie nach Schindler, A. E. (82) 1972, die eine Modifizierung der Methode von Siiteri, P. K. (88) 1963 darstellt, durchgeführt.



System der Gradientenelutionssäulenchromatographie

1 Lösungsmittelbehälter
2 Lösungsmittelbehälter (Mischungskammer)
3 Verschlußhähne
4 Magnetstab
5 Magnetrührwerk
6 Fraktionssammler

Das System der Gradientenelutionssäulenchromatographie besteht aus zwei Lösungsmittelbehältern (1 u. 2). Der Behälter 2 stellt die Mischungskammer dar, in der sich ein teflonüberzogener Magnetstab befindet, der durch das unter dem Gefäß angebrachte Magnetrührwerk verschieden schnell bewegt werden kann. Beide Behälter sind durch Kugelgelenke und Glashähne verbunden.
An die Lösungsmittelbehälter schließt sich eine Glassäule an (Durchmesser 2 cm, Länge 1 m).
Die aus der Glassäule ausfließende Flüssigkeit wird mit Hilfe eines Extraktionssammlers der Firma Serva in Reagenzgläser aufgefangen.
Die Füllung der Glassäule bestand aus einem zuerst eingebrachten Glaswattepfropf und den drei Schichten A, B und C.
Die drei Schichten bestehen im einzelnen aus folgenden Substanzen.

Schicht A: 2 g Kieselgur mit 1,5 ml Äthylenglykol und dem die radioaktiven Steroide enthaltenden Extrakt vermischt.

Schicht B: 20 g Kieselgur mit 15 ml Äthylenglykol vermischt.

Schicht C: 2 g Kieselgur mit 1 ml Wasser vermischt.

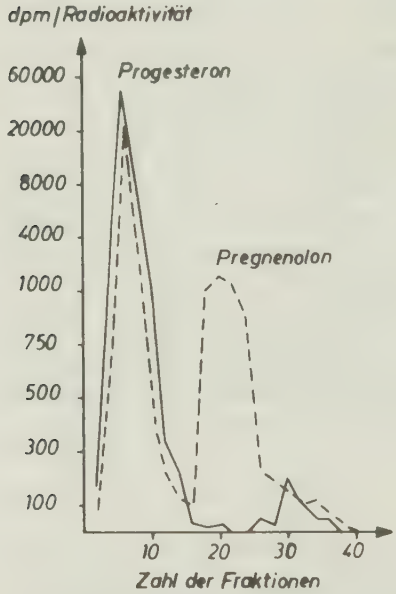
Die Substanzen der einzelnen Schichten wurden beim Einbringen in die Glassäule jeweils mit einem Glasstab komprimiert.
Die Beschickung des Systems der Gradientenelutionssäulenchromatographie geschieht folgendermaßen.
In den Zylinder 2 werden 150 ml Isooctan gefüllt, diese Flüssigkeit wird solange ohne erhöhten Druck (N_2) durch die Glassäule geschickt bis diese vollständig durchfeuchtet ist, danach passiert das restliche Isooctan die Säule unter mäßigem N_2-Druck.

Nachdem das Isooctan die Säule passiert hat wird nun bei verschlossenen Hähnen in den Behälter 2 400 ml Isooctan und in den Behälter 1 400 ml eines Gemisches aus Isooctan und Äthylacetat im Verhältnis 7:3 eingebracht (bei kurzen Säulen mit 40 Fraktionen wurden nur jeweils 150 ml Fleißmittel verwendet).
Beide Hähnen werden nun gleichzeitig geöffnet, das Rührwerk eingeschaltet, um die Fließmittel in Zylinder 2 zu mischen, so daß ein Gemisch von kontinuierlich steigender Polarität die Säule durchläuft. Die Durchflußrate wird durch Anlegen eines N_2-Druckes im Zylinder 1 und 2 geregelt.
Sind beide Lösungsmittel durchgelaufen, schließt sich eine Elution mit 50 ml Äthylacetat an. Die einzelnen Fraktionen werden mit Hilfe eines Fraktionssammlers der Firma Serva in Reagenzgläser aufgefangen.

2.2.5. Isolierung und Identifizierung der Steroide

Aus jedem zweiten Reagenzglas wurden je 0,5 ml in ein Plastikgefäß pipettiert, unter Luft getrocknet mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die darin enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer für zwei Minuten gemessen.
Auf diese Weise konnte eine Radioaktivitätskurve aufgezeichnet werden (s. Abb.).

Gradientensäulenelutionschromatographie



Da aus früheren Versuchen bekannt war, in welchen Fraktionen sich die einzelnen Steroide befinden, war neben einer Isolierung auch gleichzeitig eine Identifizierung der Steroide möglich. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die entsprechenden Fraktionen in Rundkolben gesammelt, unter Vakuum eingetrocknet, mit Äthylacetat in dickwandige Reagenzgläser übertragen und wiederum unter Vakuum eingetrocknet. (Die Hauptversuche wurden nur mit Dünnschichtchromatographie durchgeführt)

2.2.6. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Reinigung der einzelnen Steroide (bei den Hauptversuchen diente sie gleichzeitig zur Trennung).
Zur Herstellung der chromatographischen Platten wurden 40 g Kieselgel mit 80 ml dest. Wasser gemischt und mit dem von Stahl entwickelten Apparat (Brinkmann Instruments Inc.) auf Glasplatten (20 x 20 cm) in der gewünschten Dicke aufgetragen.
Nach Trocknen der Platten bei Zimmertemperatur wurden sie vor Gebrauch im Trockenofen bei 110 °C aktiviert. Nach der etwa einstündigen Aktivierung waren die Platten gebrauchsfertig.
Zu den eingetrockneten Steroiden wurde vor dem Auftragen auf die Platten das jeweils entsprechende Steroid (nicht radioaktiv) zugegeben. Das Referenzsteroid wurde vorher in Methanol gelöst (100 mg auf 100 ml Methanol) und davon jeweils 1 ml zu den einzelnen Proben zugegeben.
Das Ganze wurde möglichst kleinflächig auf die chromatographischen Platten aufgetragen. Die Platten wurden in verschließbare Glasbehälter gestellt und mit jeweils 200 ml des entsprechenden Systems entwickelt. Die einzelnen Systeme und die Reihenfolge der jeweils angewandten sind nachfolgend aufgeführt.

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIESYSTEME

DS 1	Chloroform : Äthylacetat	13 : 11
DS 2	Dichlormethan : Dioxan	19 : 1
DS 3	Chloroform (100 %)	
DS 4	Isooctan : Äthylacetat	13 : 7
DS 5	Dichlormethan : Äther	95 : 5
DS 6	Chloroform : Dioxan	94 : 6
DS 7	Chloroform : Aceton	8 : 2

Nach der zweiten Dünnschicht wurde eine Acetylierung der entsprechenden Steroide durchgeführt. Die DS 3 wurde zweimal entwickelt.
Für die einzelnen Steroide wurden folgende Dünnschichtsysteme verwendet.

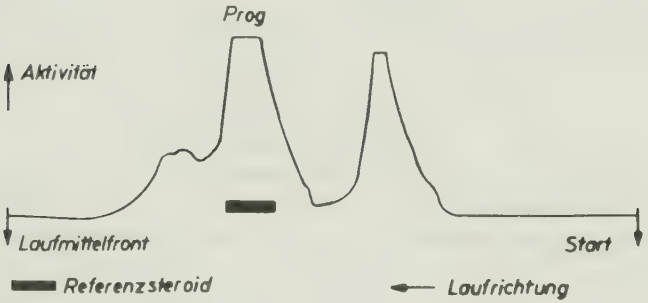
Preg und Prog	20a-OH-Preg und 20a-OH-Prog
1) DS 1	DS 5
2) DS 2	DS 6
3) Acetylierung	Acetylierung
4) DS 3	DS 3
5) DS 4	DS 4
6)	DS 7
7)	DS 1
8)	DS 2

Nachdem die Platten entwickelt waren, wurden sie getrocknet und mit Wasser besprüht. Die vorher zugegebenen Referenzsteroide zeigten sich daraufhin als weißer Fleck auf der Platte. Nach dem Vergleich der Position des Referenzsteroids mit dem Aktivitätsmaximum des Chromatogramms wurde der Bezirk um das Referenzsteroid von der Platte entfernt, in eine Glasfritte eingefüllt und die Steroide mit Äthylacetat eluiert.
Das Eluat wurde für die weitere Aufarbeitung jeweils wieder unter Vakuum eingetrocknet.

Im Folgenden sind Beispiele der Dünnschichten 1 - 4 bei der Aufarbeitung der Steroide Pregnenolon und Progesteron aufgeführt.

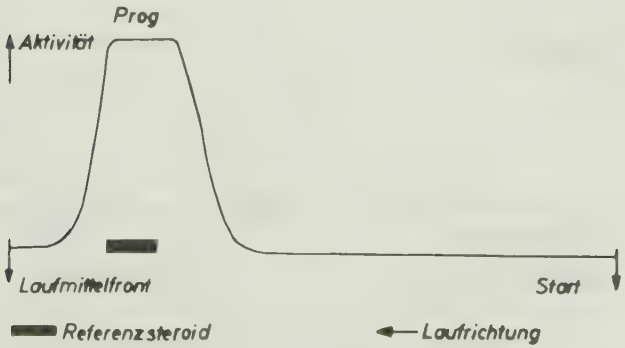
Dünnschichtchromatographie

System: $CHCL_3$:Äthylacetat 13:11



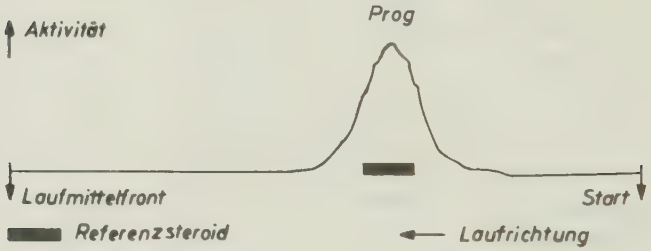
Dünnschichtchromatographie

System: Dichlormethan:Dioxan 19:1



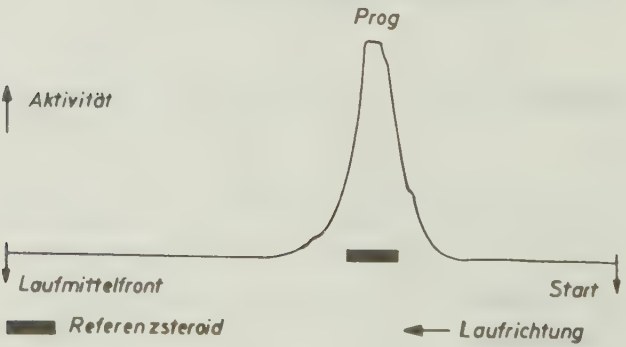
Dünnschichtchromatographie

System: Chloroform 100 %



Dünnschichtchromatographie

System: Isooctan Essigsäureäthylester 13 : 7



2.2.7. Acetylierung der Steroide

Die Acetylierung erfolgte mit jeweils 0,5 ml Pyridin und Essigsäureanhydrid für 16 Stunden, danach wurde unter Vakuum verdampft und abgesaugt.
Obwohl Progesteron nicht acetyliert werden kann, wurde der Vorgang doch durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen zu eliminieren.

2.2.8. Kristallisation der Steroide

Das Eluat der letzten Dünnschichtchromatographie wurde unter Vakuum eingetrocknet, mit Äthylacetat in dünnwandige Kristallisationsgläschen übertragen und der Inhalt unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Nun wurden ungefähr 10 mg der jeweiligen Standardsteroide in kristalliner Form hinzugegeben. Die sich im Kristallisationsgläschen befindenden Steroide wurden mit Methanol im Wasserbad aufgelöst. Es wurden nun in bestimmter Reihenfolge (s. u.) einige Tropfen organischer Flüssigkeiten zu den gelösten Steroiden hinzugegeben und die ganze Lösung für kurze Zeit bei 80 ^{o}C im Wasserbad erwärmt. Nach Zugabe der organischen Flüssigkeit wurde jeweils bei Zimmertemperatur die Ausfällung der Steroide in kristalliner Form abgewartet. Erst dann schloß sich dann die Zugabe der weiteren organischen Flüssigkeiten an.
SYSTEME DER KRISTALLISATION
1. System K 1 Methanol / Äther
2. System K 2 Methanol / Ligroin
3. System K 3 Methanol / Cyclohexan

K = Kristallisation

Nachdem die Kristalle jeweils ausgefallen waren, wurde die Flüssigkeit über den Kristallen (auch Mutterflüssigkeit = MF genannt) in ein Plastikgefäß

abpipettiert und eingetrocknet. Von den zurückgebliebenen Kristallen wurde etwa ein Drittel entnommen und ebenfalls in ein Plastikgefäß gegeben. Sowohl das Gefäß mit der eingetrockneten Mutterflüssigkeit als auch das Gefäß mit den Kristallen wurde mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt. Dieser Vorgang wurde für jede Kristallisation gesondert durchgeführt.
Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität jeweils dreimal für fünf Minuten im Flüssigkeits-szintillationsspektrometer.

2.2.9. Berechnung der Umwandlungsrate

Die Grundlage zur Berechnung ging von Untersuchungen von Schindler et al. 1972 (82) aus. Dabei wurde bei der Berechnung der Umwandlung von ^{14}C-markiertem Pregnenolon in Progesteron, bei gleichzeitiger Zugabe von ^{3}H-markiertem Progesteron folgende Verhältnisse zueinander in Beziehung gesetzt.
Anfangsverhältnis 1 (AV 1) = Preg ^{14}C / Prog ^{3}H
Endverhältnis 1 (EV 1) = Prog ^{14}C / Prog ^{3}H
Die Umwandlung von markiertem Pregnenolon in markiertes Progesteron läßt sich demnach folgendermaßen berechnen:

$$U_1 = \frac{EV}{AV}1 \times 100 \; (\%)$$

U_1 = Umwandlungsrate Preg in Prog in %
EV_1 = Endverhältnis Prog ^{14}C / Prog ^{3}H
AV_1 = Anfangsverhältnis Preg ^{14}C / Prog ^{3}H

Durch Verwendung der Doppelisotopenmethode läßt sich auch die Rückumwandlung von ^{3}H-markiertem Progesteron in Pregnenolon bestimmen. Für die Berechnung der Rückumwandlung wurde folgende Formel verwendet:

$$U_2 = \frac{EV_2}{AV_2} \times 100 \; (\%)$$

U_2 = Umwandlungsrate Prog in Preg in %
EV_2 = Endverhältnis Preg ^{3}H / Preg ^{14}C
AV_2 = Anfangsverhältnis Prog ^{3}H / Preg ^{14}C

3. ERGEBNISSE

3.1. Meßwerte der Versuche 1 - 17 und der Zusatzversuche 1 und 2

Versuch 1

Preg in Prog (Umwandlung Pregnenolon in Progesteron)

Kontrollwert: als Beispiel für die Kristallisation sind hier die Werte der einzelnen Kristalle (K) und der Mutterflüssigkeiten (MF) aufgeführt. Bei den späteren Versuchen wird darauf verzichtet.

1 / 100	0.575
1. MF.	0.332
1. K.	0.328
2. MF.	0.327
2. K.	0.325
3. MF.	0.326
3. K.	0.328

Bestimmung der Wiederauffindungsrate

1/ 20 ^{3}H 55600 dpm dpm total 1 112 000 dpm
1/ 20 ^{14}C 17600 dpm dpm total 352 000 dpm

1/ 100 der Ausgangsratio
^{3}H 19500 dpm dpm total 1 950 000 dpm
^{14}C 11200 dpm dpm total 1 120 000 dpm

somit ergibt sich als Wiederauffindungsrate bei
^{3}H : 1 112 000 / 1 950 000 x 100% = 57%
^{14}C : 352 000 / 1 120 000 x 100% = 31%

Die Umwandlungs- und Rückumwandlungsraten beim Kontrollwert sind:

Preg in Prog	57%
Preg in 20α-OH-Preg	0%
Prog in Preg	0%
Prog in 20α-OH-Prog	0%

Versuch 1

Clomiphen

Preg in Prog			U - Rate
Clom 1	1 / 1 00	0. 622	
	1. K	0. 457	
	2. K	0. 446	70 %
	3. K	0. 442	
Prog in Preg			0 %
Clom 2	1 / 100	0. 607	
	1. K	0. 445	
	2. K	0. 452	74 %
	3. K	0. 450	
Prog in Preg			0 %
Clom 3	1 / 100	0. 623	
	1. K	0. 303	
	2. K	0. 312	49 %
	3. K	0. 309	
Prog in Preg			0 %
Clom 4	1 / 100	0. 573	
	1. K	0. 005	
	2. K	0. 005	1 %
	3. K	0. 005	
Prog in Preg			0 %

Versuch 2

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate
Kontrollwert	0. 584	0. 428	73 %
Th 1165 a 1	0. 577	0. 528	92 %
Th 1165 a 2	0. 603	0. 547	91 %
Th 1165 a 3	0. 610	0. 546	90 %
Th 1165 a 4	0. 613	0. 103	17 %

Umwandlung von Progesteron in Pregnenolon

Prog in Preg			
Kontrollwert	1. 711	0. 005	0,35 %
Th 1165 a 1	1. 733	0. 009	0,8 %
Th 1165 a 2	1. 658	0. 031	2 %
Th 1165 a 3	1. 639	0. 013	0,5 %
Th 1165 a 4	1. 632	0. 002	0,2 %

Versuch 3

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate
Kontrollwert	0. 742	0. 686	92 %
Th 1165 a 1	0. 602	0. 711	118 %
Th 1165 a 2	0. 597	0. 689	115 %
Th 1165 a 3	0. 642	0. 636	99 %
Th 1165 a 4	0. 651	0. 490	75 %
Th 1165 a 5	0. 275	0. 046	17 %
Clom 1	0. 644	0. 717	111 %
Clom 2	0. 645	0. 725	112 %
Clom 3	0. 653	0. 508	78 %
Clom 4	0. 649	0. 009	1 %

Inkubation ohne Plazenta und ohne Substanzen
(Blankwert)

Preg in Prog	0. 272	0. 0006	0,1 %
Prog in Preg	3. 67	0. 0002	0,01 %

Versuch 3

Prog in Preg	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate
Kontrollwert	1. 348	0. 011	0,9 %
Th 1165 a 1	1. 660	0. 012	0,7 %
Th 1165 a 2	1. 676	0. 018	1,1 %
Th 1165 a 3	1. 559	0. 010	0,6 %
Th 1165 a 4	1. 537	0. 002	0,2 %
Th 1165 a 5	3. 630	0. 006	0,2 %

Versuch 3

Prog in Preg

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert	1. 348	0. 011	0,9
Th 1165 a 1	1. 660	0. 012	0,7
Th 1165 a 2	1. 676	0. 018	1,1
Th 1165 a 3	1. 559	0. 010	0,6
Th 1165 a 4	1. 537	0. 002	0,2
Th 1165 a 5	3. 630	0. 006	0,2

Versuch 3

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert	0. 742	0. 686	92
Th 1165 a 1	0. 602	0. 711	118
Th 1165 a 2	0. 597	0. 689	115
Th 1165 a 3	0. 642	0. 636	99
Th 1165 a 4	0. 651	0. 490	75
Th 1165 a 5	0. 275	0. 046	17
Clom 1	0. 644	0. 717	111
Clom 2	0. 645	0. 725	112
Clom 3	0. 653	0. 508	78
Clom 4	0. 649	0. 009	1

Inkubation ohne Plazenta und ohne Substanzen (Blankwert)

Preg in Prog	0. 272	0. 0006	0,1
Prog in Preg	3. 67	0. 0002	0,01

Versuch 4

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert	0. 614	0. 514	84
Th 1165 a 1	0. 523	0. 433	83
Th 1165 a 2	0. 591	0. 547	93
Th 1165 a 3	0. 575	0. 518	90
Th 1165 a 4	0. 604	0. 092	15
Clom 1	0. 646	0. 603	93
Clom 2	0. 606	0. 435	71
Clom 3	0. 607	0. 490	80
Clom 4	0. 634	0. 008	1

Umwandlung von Prog in Preg

Kontrollwert	1. 629	0. 016	0,6
Th 1165 a 1	1. 91	0. 028	1,5

Versuch 5

Preg in Prog

Kontrollwert 1: Inkubation 140 min. nach Plazentageburt
Kontrollwert 2: Inkubation 180 min. nach Plazentageburt

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 526	0. 471	90
Kontrollwert 2	0. 472	0. 408	86
Th 1165 a 1	0. 547	0. 455	83
Th 1165 a 2	0. 554	0. 406	73
Th 1165 a 3	0. 514	0. 359	70
Th 1165 a 4	0. 582	0. 050	9
Clom 1	0. 555	0. 537	97
Clom 2	0. 632	0. 606	96
Clom 3	0. 600	0. 470	78
Clom 4	0. 595	0. 005	1

Versuch 6

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert	0. 595	0. 586	95
Th 1165 a 1	0. 610	0. 585	92
Th 1165 a 2	0. 555	0. 466	87
Th 1165 a 3	0. 588	0. 502	84
Th 1165 a 4	0. 570	0. 030	5
Clom 1	0. 614	0. 504	85
Clom 2	0. 580	0. 546	90
Clom 3	0. 590	0. 433	74
Clom 4	0. 573	0. 003	1

Beim Kontrollansatz wurden zwei Proben von 1 / 100 der Ausgangsratio entnommen.

Kontrollwert	0. 602	0. 566	94,5

(der zweite Wert des 1 / 100 ergibt somit eine Abweichung 0,5 %)

Versuch 7

Preg in Prog

Kontrollwert 1: Inkubation 145 min. nach Plazentageburt
Kontrollwert 2: Inkubation 70 min. nach Plazentageburt

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 600	0. 551	92
Kontrollwert 2	0. 660	0. 851	129
Th 1165 a 1	0. 603	0. 588	98
Th 1165 a 2	0. 548	0. 591	108
Th 1165 a 3	0. 613	0. 634	103
Th 1165 a 4	0. 590	0. 054	9
Clom 1	0. 584	0. 584	100
Clom 2	0. 597	0. 632	106
Clom 3	0. 617	0. 537	87
Clom 4	0. 566	0. 003	1

Versuch 8

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 645	0. 345	54
Kontrollwert 2	0. 501	0. 546	109
Th 1165 a 1	0. 646	0. 661	102
Th 1165 a 2	0. 612	0. 339	55
Th 1165 a 3	0. 639	0. 423	66
Th 1165 a 4	0. 615	0. 045	7
Clom 1	0. 668	0. 648	97
Clom 2	0. 641	0. 676	106
Clom 3	0. 651	0. 296	46
Clom 4	0. 662	0. 004	1

Versuch 9

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 957	0. 544	57
Kontrollwert 2	0. 995	1. 044	105
Th 1165 a 1	1. 046	0. 805	81
Th 1165 a 2	0. 973	0. 819	84
Th 1165 a 3	0. 976	0. 550	56
Th 1165 a 4	1. 028	0. 067	7
Clom 1	1. 022	0. 943	92
Clom 2	0. 882	1. 086	123
Clom 3	0. 950	0. 596	63
Clom 4	0. 933	0. 013	1

Versuch 10

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	1. 002	0. 493	49
Kontrollwert 2	0. 952	0. 988	104
Th 1165 a 1	0. 839	0. 839	100
Th 1165 a 2	0. 921	0. 677	74
Th 1165 a 3	0. 932	0. 550	59
Th 1165 a 4	0. 964	0. 049	5
Clom 1	0. 919	0. 925	101
Clom 2	0. 957	0. 996	104
Clom 3	0. 917	0. 367	40
Clom 4	0. 992	0. 015	2

Versuch 11

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 631	0. 296	47
Kontrollwert 2	0. 615	0. 629	102
Th 1165 a 1	0. 607	0. 351	58
Th 1165 a 2	0. 624	0. 470	75
Th 1165 a 3	0. 727	0. 353	49
Th 1165 a 4	0. 658	0. 024	4
Clom 1	0. 604	0. 512	85
Clom 2	0. 588	0. 518	88
Clom 3	0. 598	0. 363	61
Clom 4	0. 653	0. 007	1

Versuch 12

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 695	0. 343	49
Kontrollwert 2	0. 664	0. 632	95
Th 1165 a 1	0. 593	0. 434	73
Th 1165 a 2	0. 592	0. 500	85
Th 1165 a 3	0. 659	0. 377	57
Th 1165 a 4	0. 641	0.	6
Clom 1	0. 653	0. 598	92
Clom 2	0. 594	0. 557	94
Clom 3	0. 627	0. 323	52
Clom 4	0. 650	0. 005	1

Versuch 13

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 611	0. 266	44
Kontrollwert 2	0. 600	0. 573	95
Th 1165 a 1	0. 640	0. 275	43
Th 1165 a 2	0. 587	0. 299	51
Th 1165 a 3	0. 615	0. 248	40
Th 1165 a 4	0. 597	0. 361	60
Clom 1	0. 600	0. 334	56
Clom 2	0. 613	0. 417	68
Clom 3	0. 653	0. 198	30
Clom 4	0. 643	0. 364	57

Versuch 14

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 590	0. 299	51
Kontrollwert 2	0. 606	0. 567	94
Th 1165 a 1	0. 571	0. 323	57
Th 1165 a 2	0. 625	0. 353	57
Th 1165 a 3	0. 597	0. 345	58
Th 1165 a 4	0. 641	0. 325	51
Clom 1	0. 655	0. 334	51
Clom 2	0. 623	0. 372	60
Clom 3	0. 608	0. 383	63
Clom 4	0. 625	0. 223	36

Versuch 15

Preg in Prog	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 691	0. 381	55
Kontrollwert 2	0. 623	0. 0005	0,08
(Kontrollwert 2 = Blankansatz)			
Th 1165 a 1	0. 680	0. 638	94
Th 1165 a 2	0. 713	0. 719	101
Th 1165 a 3	0. 664	0. 529	80
Th 1165 a 4	0. 702	0. 458	65
Clom 1	0. 690	0. 546	79
Clom 2	0. 669	0. 660	99
Clom 3	0. 728	0. 784	108
Clom 4	0. 709	0. 641	90

Versuch 16

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 643	0. 263	41
Kontrollwert 2	0. 730	0. 354	48
(Kontrollwert 2 inkubiert wie Kontrollwert 1)			
Th 1165 a 1	0. 701	0. 352	50
Th 1165 a 2	0. 730	0. 420	57
Th 1165 a 3	0. 578	0. 251	43
Th 1165 a 4	0. 626	0. 366	59
Clom 1	0. 702	0. 277	40
Clom 2	0. 571	0. 469	82
Clom 3	0. 651	0. 577	89
Clom 4	0. 607	0. 297	49

Versuch 17

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollwert 1	0. 643	0. 249	39
Kontrollwert 2	0. 615	0. 005	1
(Kontrollwert 2 = Blankwert mit Plazenta, Inkubationsdauer 0 min.)			
Th 1165 a 1	0. 641	0. 318	50
Th 1165 a 2	0. 599	0. 332	55
Th 1165 a 3	0. 602	0. 383	64
Th 1165 a 4	0. 618	0. 203	33
Clom 1	0. 645	0. 264	41
Clom 2	0. 608	0. 413	68
Clom 3	0. 601	0. 389	65
Clom 4	0. 594	0. 210	35

Zusatzversuch 1

Preg in Prog

	1 / 100	Ø d. K.	U - Rate (%)
Kontrollansatz 1	0. 541	0. 350	66
Kontrollansatz 2	0. 601	0. 493	82
Kontrollansatz 3	0. 547	0. 603	110
Kontrollansatz 4	0. 537	0. 552	102
Kontrollansatz 5	0. 587	0. 466	81
Kontrollansatz 6	0. 554	0. 430	77

Kontrollansatz 1	sofort inkubiert 30 min. inkubiert
Kontrollansatz 2	sofort inkubiert 60 min. inkubiert
Kontrollansatz 3	sofort inkubiert 120 min. inkubiert
Kontrollansatz 4	nach 30 min. ink.120 min. inkubiert
Kontrollansatz 5	nach 60 min. ink.120 min. inkubiert
Kontrollansatz 6	nach 90 min. ink.120 min. inkubiert

Bemerkung: Unter sofort inkubiert wird die vom Arbeitsaufwand her gesehene schnellst mögliche Zeitspanne zwischen Plazentageburt und Inkubationsbeginn verstanden.
In Wirklichkeit verging von der Plazentageburt bis zum Inkubationsbeginn 40 Minuten. Diese Zeitspanne ist im folgenden Schaubild bereits berücksichtigt.

Zusatzversuch 2

Preg in Prog	1/100	Ø d.K.	U-Rate (%)
Kontrollwert mit Plazenta	0. 744	0. 444	60
c-AMP 1	0. 588	0. 211	36
c-AMP 2	0. 528	0. 293	55
c-AMP 3	0. 559	0. 260	47
Clom 1	0. 595	0. 541	91
c-AMP 4	0. 517	0. 005	1,0
Th 1165 a	0. 504	0. 006	1,2
Clom 2	0. 543	0. 007	1,3

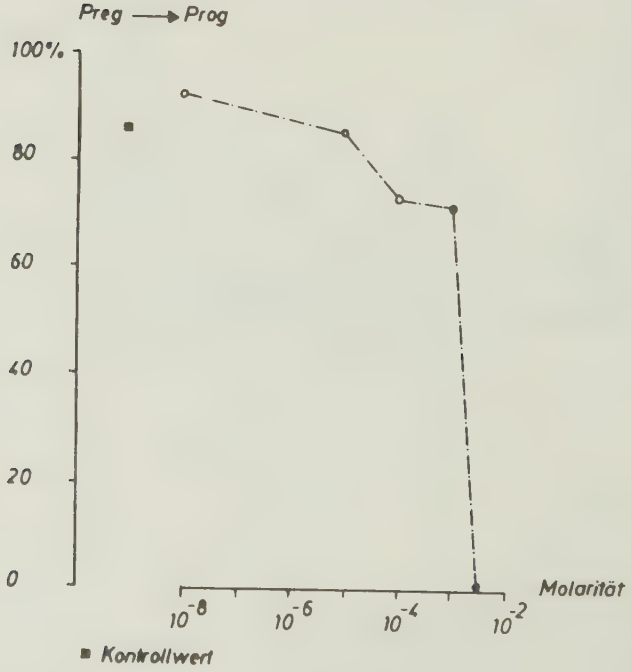
verwendete Konzentrationen	Molarität
c-AMP 1	10^{-4}
c-AMP 2	10^{-8}
c-AMP 3	10^{-10}
c-AMP 4	10^{-8}
Clom 1	10^{-8}
Clom 2	10^{-8}
Th 1165 a	10^{-8}

c-AMP 4, Th 1165 a und Clom 2 wurden jeweils ohne Plazenta als Blankversuch inkubiert.

3.2.1. Clomiphen

Preg ⟶ Prog

Molarität	10^{-8}	10^{-6}	10^{-5}	$5\cdot10^{-5}$	10^{-4}	10^{-3}	$5\cdot10^{-2}$
V_1			70		74	49	1
V_2							
V_3		111		112		78	1
V_4	93				71	80	1
V_5	97		96			78	1
V_6	85		90			74	1
ø V_1-V_6	92	111	85	112	73	72	1

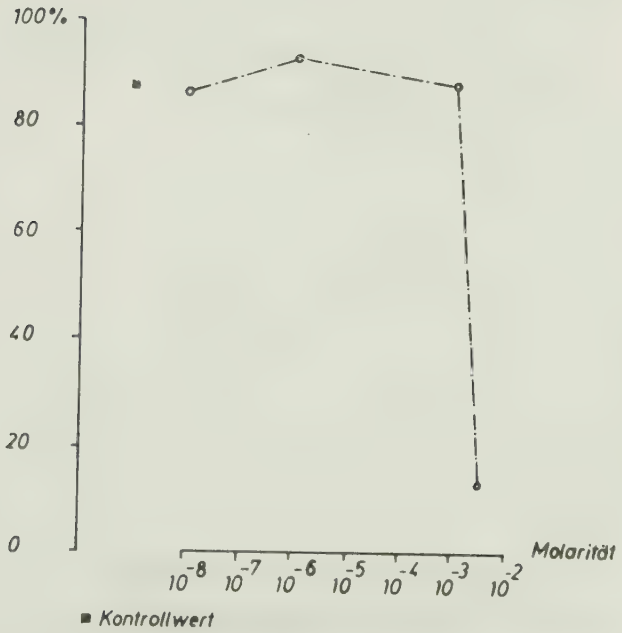


Th 1165 a

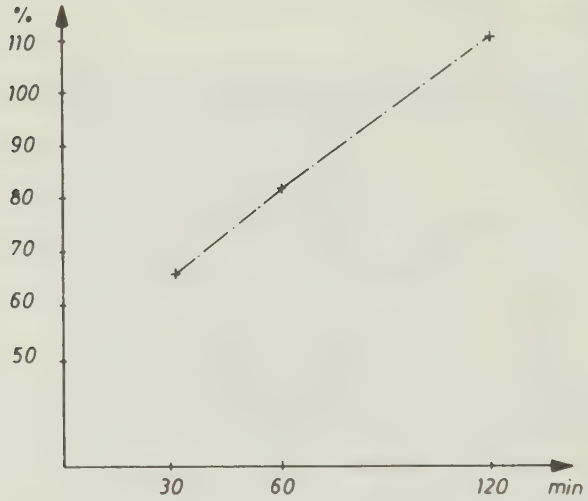
Preg ⟶ Prog

Molarität	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	$5\cdot10^{-5}$	10^{-3}	10^{-2}	$5\cdot10^{-2}$
V_2			92	91	90		17
V_3		118	115		99	75	17
V_4	83		93		90		15
V_5	83		73		70		9
V_6	92		87		84		5
∅ V_2-V_6	86	118	92	91	87	75	13

Preg ⟶ Prog

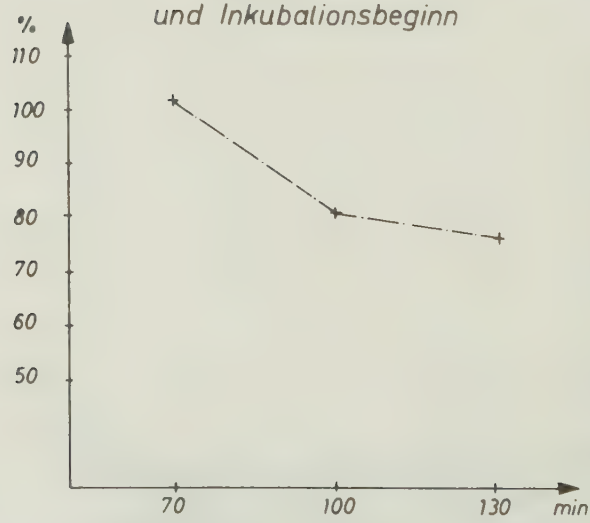


3.2.2. *Abhängigkeit der Umwandlungsrate von der Inkubationsdauer*



Umwandlungsrate in %; Inkubationszeit in min

Umwandlungsrate in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen Plazentageburt und Inkubationsbeginn



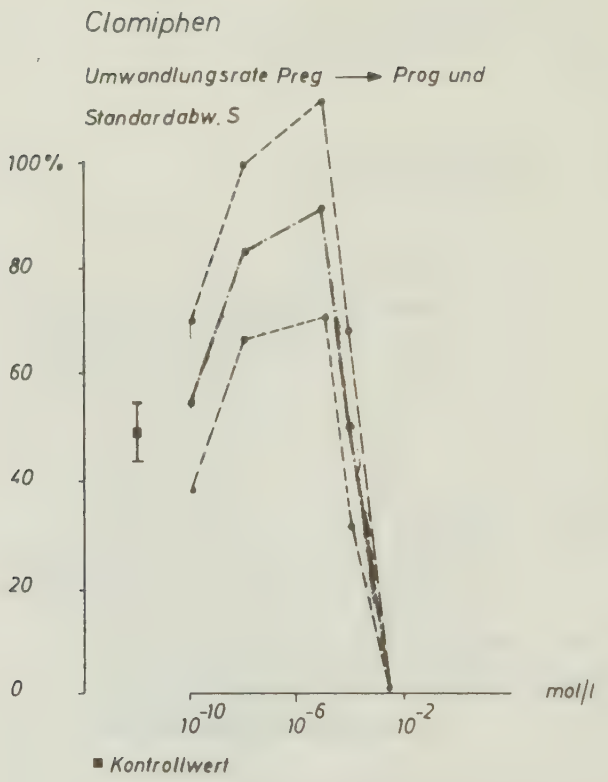
Zeitspanne: Plazentageburt/Inkubationsbeginn

3.2.3.

Clomiphen

Preg ⟶ Prog

Molarität	10^{-10}	10^{-8}	10^{-5}	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-2}$
V_8		97	106	46	1
V_9		92	123	63	1
V_{10}		101	104	40	2
V_{11}		85	88	61	1
V_{12}		92	94	52	1
V_{13}	57	56	68	30	
V_{14}	51	60	63	36	
V_{15}	79	99	108	90	
V_{16}	40	82	89	49	
V_{17}	41	68	65	35	
$\phi V_8 - V_{17}$	54	83	91	50	1



mol/l	10^{-10}	10^{-8}	10^{-5}	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-2}$	K
$\sum(x_i - \bar{x})^2$	1008	2394	3718	2832	1	274
S	±15,87	±16,31	±20,33	±17,74	±0,5	±5,52

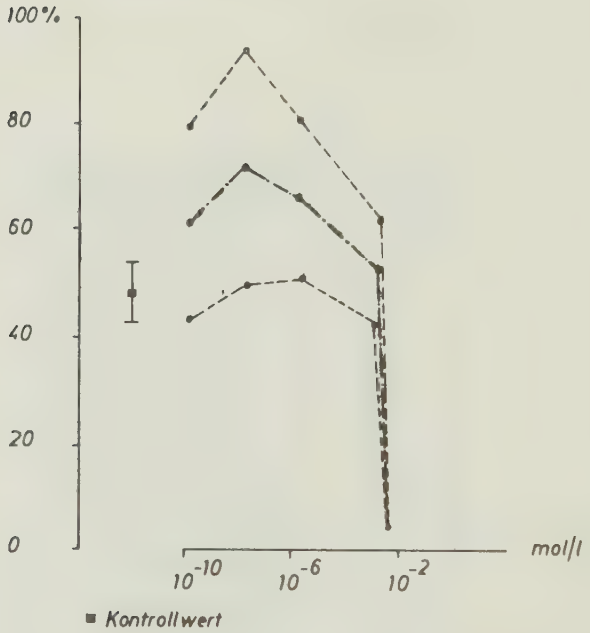
Th 1165a

Preg ⟶ Prog

Molarität	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-2}$
V_8		102	55	66	7
V_9		81	84	56	7
V_{10}		100	74	59	5
V_{11}		58	75	49	4
V_{12}		73	85	57	6
V_{13}	60	43	51	40	
V_{14}	57	57	58	51	
V_{15}	94	101	80	65	
V_{16}	50	57	43	59	
V_{17}	50	55	64	33	
$\phi V_8 - V_{17}$	62	73	67	54	6

Th 1165 a

Umwandlungsrate Preg ⟶ Prog und
Standardabweichung S



mol/l	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-2}$	K
$\sum (x_i - \bar{x})^2$	1341	4379	1961	999	7	274
S	± 18,31	± 22,06	± 14,76	± 10,54	± 1,32	± 5,52

3.3. Erläuterung der Ergebnisse

3.3.1. Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, die geeigneten Konzentrationen der einzelnen Pharmaka zu ermitteln. Wir begannen mit sehr hohen Dosen und reduzierten dann die Konzentrationen immer mehr.
Bei Clomiphen und Th 1165 a wurden in einem Spektrum von 10^{-8} molar bis $5 \cdot 10^{-2}$ molar jeweils sieben verschiedene Konzentrationen untersucht.
Eindeutige Hemmwirkung auf die Enzymaktivität konnte bei Clomiphen und Th 1165 a bei der höchsten Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ molar erzielt werden.
Schwierigkeiten ergaben sich jedoch bei den niedrigsten Konzentrationen. Sie lagen bei allen Substanzen etwa im Kontrollbereich. Da die Kontrollwerte eine nahezu vollständige Umwandlung von Pregnenolon nach Progesteron aufwiesen, konnte mit der bisher angewandten Versuchsanordnung nicht geklärt werden, ob die ebenfalls fast vollständige Verstoffwechslung von Pregnenolon in Progesteron im niederen Konzentrationsbereich auf ein indifferentes Verhalten der benutzten Pharmaka zurückzuführen ist oder ob die Medikamente eine stimulierende Wirkung besitzen, die aber dadurch, daß die Kontrollwerte nach oben kaum einen Spielraum ließen, nicht zum Ausdruck kam.
Außer der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron wurde in den ersten Versuchen auch noch die Rückumwandlung von Progesteron in Pregnenolon untersucht, sowie die weitere Verstoffwechslung in 20α-OH-Derivate. Dabei fand sich in einigen Fällen eine Rückumwandlung, die jedoch sehr gering war und im höchsten Fall 2% betrug.
Eine Metabolisierung von Progesteron in 20α-OH-Prog konnte nur mit Hilfe des Chromatogramms der Gradientensäule nachgewiesen werden.

Quantitativ war sie nicht faßbar, da kein konstantes Isotopenverhältnis erzielt werden konnte.
Wenn diese Verstoffwechslung des Progesterons auch minimal war, so erklärt sie (evtl. zusammen mit anderen Stoffwechselschritten) doch die teilweise über 100% angestiegene Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron.

3.3.2. Kinetische Studie

Um eine mögliche Stimulierung des Stoffwechsels durch niedere Konzentrationen der Pharmaka nachweisen zu können, mußte die Umwandlungsrate der Kontrollwerte gesenkt werden, und zwar auf etwa 50%, so daß für die Stimulation nach oben und für die Hemmung nach unten genügend Spielraum blieb. Dazu wurde die Abhängigkeit der Umwandlungsrate von der Dauer der Inkubation untersucht. Aus der gewonnenen Kurve ergab sich durch Interpolation eine Inkubationszeit von 15 Minuten.
Zur methodischen Absicherung ermittelten wir die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Zeitraum zwischen Plazentageburt und Inkubationsbeginn. Dabei war bis 70 Minuten nach der Geburt kaum ein Nachlassen der Enzymaktivitäten feststellbar. Diese Zeitspanne wurde in den späteren Versuchen wenn irgend möglich eingehalten.

3.3.3. Zusammenfassung der Vorversuche

- Bei zweistündiger Inkubationszeit wurde im Kontrollansatz sowie bei allen Pharmaka in den niedersten Konzentrationen eine maximale Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron festgestellt.
- In den höchsten Konzentrationen ergab sich jeweils eine eindeutige Hemmung.
- Die Verstoffwechslung von Progesteron in Pregnenolon und 20α-OH-Progesteron war sehr gering.

- Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde etwa 50% des Pregnenolons in Progesteron in den Kontrollversuchen umgewandelt.

3.3.4. Folgerungen für die Hauptversuche

- Da die 20α-Hydroxylierung minimal war, konnte die Gradientensäule auf 40 Fraktionen gekürzt werden, d.h. die 20α-OH-Fraktionen wurden nicht gesammelt und quantitativ bestimmt.
- Da auch die Rückumwandlung von Prog in Preg höchstens 2% betrug, konnte auf die Säulenchromatographie verzichtet werden. Nach von uns durchgeführten Untersuchungen ergab sich kein Unterschied in der Umwandlungsrate bei der Auftrennung der Hormone Progesteron und Pregnenolon durch die Gradientensäule oder nur durch die verschiedenen Dünnschichtsysteme. So wurde ferner die Auftrennung und die Reinigung von Progesteron durch die Dünnschichtchromatographie und die Kristallisation bewerkstelligt.
- Die Inkubationsdauer wurde von 120 Minuten auf 15 Minuten verkürzt.
- Verwendete Konzentrationen:
  Clomiphen: 10^{-8}, 10^{-5}, 10^{-4}, $5 \cdot 10^{-2}$ molar
  Th 1165 a: 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-3}, $5 \cdot 10^{-2}$ molar
  Die höchsten Konzentrationen wurden nur in den Versuchen 8 bis 12 untersucht. An ihre Stelle traten in den Versuchen 13 bis 17 bei beiden Pharmaka jeweils ein Ansatz mit der Konzentration 10^{-10} molar.

3.4. Hauptversuche

Eine eindeutig starke Hemmwirkung zeigten Clomiphen und Th 1165 a bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ molar (Signifikanz 0,1%). Bei der niedrigsten Konzentration von 10^{-10} molar lagen die Ergebnisse bei beiden Substanzen im Bereich des Kontrollwertes. Eine deutliche Stimulation trat bei einer Konzentration von 10^{-8} molar sowohl bei Clomiphen (Signifikanz 0,1%) als auch bei Th 1165 a (Signifikanz 1,0%) auf. Die stärkste stimulierende Wirkung besaß Clomiphen in der Konzentration 10^{-5} molar (Signifikanz 0,1%). Th 1165 a zeigte noch eine leichte Stimulation bei 10^{-6} molar.
Alle anderen untersuchten Konzentrationen wiesen keine signifikante Abweichung vom Kontrollwert auf.

3.5. Blankversuche und Untersuchungen zur Methode

- In den Versuchen 3 und 15 wurden die markierten Steroide ohne Zugabe von Gewebe unter sonst identischen Bedingungen inkubiert. In beiden Versuchen ergab sich praktisch keine Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron (in Versuch 3: 0,1%, in Versuch 15: 0, 08%). Daraus kann gefolgert werden, daß eine nichtenzymatische Metabolisierung der radioaktiv markierten Steroide nicht stattfand.
- In Versuch 16 wurden zwei Kontrollansätze unter identischen Bedingungen inkubiert. Es ergab sich eine Abweichung von 7% (Kontrollansatz 1: 41%, Kontrollansatz 2: 48%).
- In Versuch 17 wurde ein Kontrollansatz sofort nach der Zugabe von homogenisiertem Gewebe mit Äthylacetat abgestoppt. Es fand eine Umwandlung von 1% statt. Dies zeigt, daß schon wenige Sekunden, die erstens aus technischen Gründen und zweitens wegen

der etwas verzögerten Phasenmischung zwischen Homogenisat - Phosphatpuffergemisch einerseits und Äthylacetat andererseits verstrichen sind, ausreichen, um eine, wenn auch minimale Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron durchzuführen, ein Beweis für die relativ hohe Aktivität der 3ß-hydroxy-Steroiddehydrogenase in der Plazenta.

-In den Versuchen 8 - 13 wurde jeweils ein Kontrollansatz zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde maximale Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron erzielt, was mit den Vorversuchen Versuch 1 - 7 übereinstimmt. Damit ist die Vergleichbarkeit der Vorversuche mit den Hauptversuchen bestätigt. Dies war auch zu erwarten, da die methodische Abänderung, abgesehen von der Verkürzung der Inkubationszeit, nur die Auftrennung von Pregnenolon und Progesteron, sowie das Reinigungsverfahren von Progesteron tangierte.

3.6. Statistik

Da die Anzahl der Versuche für die statistische Berechnung zu gering ist, ist eine genaue Aussage über die Signifikanz der Werte nicht möglich. Trotzdem ergaben sich aufgrund der relativ konstanten Werte doch teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen (Mittelwerte) der einzelnen Substratkonzentrationen. Zusammen mit den Vorversuchen zeichnen sich zumindest im Bereich der höchsten und der niedrigsten Konzentrationen eindeutige Trends jeweils ab. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des gepaarten Student T - Tests vorgenommen.

Tabellen zur Statistik

Erläuterung: K = Kontrollwert
S = Signifikanz in % Fehlerwahrscheinlichkeit

Clom und Th 1165 a	1	10^{-10} molar
Clom und Th 1165 a	2	10^{-8} molar
Th 1165 a	3	10^{-6} molar
Clom	3	10^{-5} molar
Clom und Th 1165 a	4	10^{-3} molar
Clom und Th 1165 a	5	$5 \cdot 10^{-2}$ molar

Die Werte hinter den Konzentrationsnummern repräsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration.

Stat. Tab. Clomiphen

K.47 \ 1.54 / S keine	1.54 \ 2.73 / S keine	2.93 \ 5. 1 / S<0,1%
K.49 \ 2.83 / S<0,1%	1.54 \ 3.79 / S<5 %	3. 91 \ 4. 50 / S<0,1%
K.49 \ 3. 90 / S<0,1	1.54 \ 4.48 / S keine	3.103 \ 5. 1 / S<0,1%
K.49 \ 4. 50 / S keine	2. 83 \ 3. 91 / S<5%	4. 52 \ 5. 1 / S<0,1%
K.51 \ 5. 1 / S<0,1%	2. 83 \ 4. 50 / S<0,1%	

Stat. Tab. Th 1165a

K. 47 \ 1. 62 / S keine	1. 62 \ 2. 63 / S keine	2. 83 \ 5. 6 / S<0,1%
K. 49 \ 2. 73 / S< 1%	1. 62 \ 3. 59 / S keine	3. 67 \ 4. 54 / S< 5%
K. 49 \ 3. 67 / S< 1%	1. 62 \ 4. 50 / S keine	3. 75 \ 5. 6 / S<0,1%
K. 49 \ 4. 54 / S keine	2. 73 \ 3. 67 / S keine	4. 57 \ 5. 6 / S<0,1%
K. 51 \ 5. 6 / S<0,1%	2. 73 \ 4. 54 / S< 1%	

Molarität	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-2}$
Substanz							
Clomiphen	0	↑↑		↑↑		0	↓↓
Th 1165a	0	↑	↑			0	↓↓

Erläuterung: ↑↑ = Stimulierung mit S.<0,1%
↓↓ = Hemmung mit S.<0,1%
↑ = Stimulierung mit S.< 1%
↓ = Hemmung mit S.< 1%
0 = keine signifikante Abweichung vom Kontrollwert

3.7. Zyklisches AMP

Schließlich war es noch interessant, eventuelle Zusammenhänge der Progesteronsyntheseratesteigerung auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es tauchte die Fragestellung auf, ob die Stimulierung der Progesteronbildung wohl über die Vermittlung des c-AMP geschehe. Wir inkubierten c-AMP in der Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-10} molar, in einem Bereich also, in dem die maximale Stimulation unserer verwendeten Medikamente lag. Die Umwandlungsrate bei Inkubation mit c-AMP lag bei jeder Konzentration unter der des Kontrollwertes (60%) (bei 10^{-4} = 36%, 10^{-8} = 55%, 10^{-10} = 47%). Die Vermutung, die Stimulation würde über eine Vermittlung des c-AMP verlaufen, konnte also durch diesen Versuch nicht bestätigt werden. Auf die spezielle Problematik des c-AMP, was Permeation und Inaktivierung angeht, wird noch in der Diskussion eingegangen.
In diesem Versuch wurden weiterhin mit den von uns verwendeten Medikamenten und c-AMP in der Konzentration von jeweils 10^{-8} molar Ansätze ohne Zugabe des Enzymsystems (Plazenta) durchgeführt. Es ergab sich jeweils eine Umwandlung von ungefähr 1,3% bei jeder Substanz. Dieses Ergebnis bestätigt die von uns schon früher gewonnene Erkenntnis, daß eine Metabolisierung des Pregnenolons ohne Enzymsystem kaum erfolgt.

4. Diskussion

Während in früher durchgeführten Untersuchungen zur Beeinflussung des 3ß-ol-Dehydrogenase-Δ^5-Isomerase-systems meist hohe Dosen von Steroiden und Pharmaka verwandt wurden (23, 85), war es unser Anliegen, die Wirkung der von uns verwandten Medikamente auch in therapeutisch angewandten Konzentrationen zu untersuchen. Schwierigkeiten traten jedoch insofern auf, als bei dem üblichen Vorgehen mit der Doppelisotopenmethode nach Siiteri et al. 1968 (89) die Umwandlungsrate von Pregnenolon nach Progesteron schon im Kontrollansatz nahezu maximal war. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, das enzymkinetische Verhalten der 3ß-ol-DHG-Δ^5-Isomerase darzustellen.
Dabei fanden wir bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten eine Umwandlungsrate von ungefähr 50%. Zu ähnlichen Ergebnissen waren früher schon Ryan et al. 1966 (81) und Depp et al. 1973 (23) gelangt. Ryan fand in Mikrosomenfraktionen der menschlichen Plazenta eine 50%ige Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron bei einer Inkubationsdauer von 10 Minuten. Dieselbe Inkubationszeit benutzten auch Depp et al. Ein anderes Problem war die Deutung der über 100% hinausgehenden Umwandlungsrate in einzelnen Ansätzen. Dieses Phänomen kann erstens damit erklärt werden, daß außer der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron auch eine Umkehrung dieses Stoffwechselschrittes stattfinden kann. Ähnlich wie bei den Versuchen von Lommer et al. 1970 (61) mit der Rattennebenniere ergab sich jedoch auch bei unseren Untersuchungen nur eine geringe Rückumwandlungsrate. Rosner et al. 1965 (80) beschrieben denselben Metabolismus in den Testes von Kaninchen. Schumacher 1975 (85) erzielte durch Verwendung von Kofaktoren bei Inkubation von menschlichem Plazentagewebe eine erhebliche Rückum-

wandlung.
Zweitens dürfte auch die Hydroxilierung von Progesteron zu 20α-OH-Progesteron eine Rolle gespielt haben. Dieser Stoffwechselweg in der menschlichen Plazenta wurde unter anderem von Little et al. 1959 (60), Gabbe et al. 1971 (30), Schumacher 1975 (85), jeweils bei Zugabe von Kofaktoren nachgewiesen. Daß wir ohne exogene Kofaktoren arbeiteten, dürfte wohl die Erklärung für die geringe Aktivität der 20α-Hydroxy-Dehydrogenase in unseren Versuchen sein. Der Zugabe von Kofaktoren kommt sicher auch eine nivellierende Wirkung zu, worauf die Analyse der endogenen Gewebskonzentration von ATP und NAD in reifen Plazenten durch Dawson et al. 1969 (21) hindeutet. Es zeigte sich, daß der ATP- und NAD-Spiegel einen zweiphasigen jahreszeitlichen Verlauf aufweist, wobei Mittelwertsabweichungen bei ATP von 154% und bei NAD von 227% festgestellt wurden.
Neben den Kofaktoren sind noch viele andere Mechanismen bei der plazentaren Steroidgenese von Relevanz. Aus den Untersuchungen von Wiener et al. 1968 (112) geht hervor, daß dem endogenen Steroidspiegel wegen der zahlreichen kompetitiven und nicht-kompetitiven Feed-Back Mechanismen eine entscheidende Rolle zufällt. Besonders Steroide, die am C_{20}-Atom eine Sauerstofffunktion und eine Δ^4-3-keto Konfiguration aufweisen, vermögen die Δ^5-3ß-ol-DHG spezifisch zu hemmen. So konnte Townsley 1975 (104) für die Δ^5-3ß-ol-DHG der normalen termingerechten menschlichen Plazenta an Hand der Verstoffwechslung von DHEA nachweisen, daß Δ^4-3-keto Substanzen, wie Androstendion und Testosteron zusammen mit Progesteron und seinen Derivaten die stärksten natürlich vorkommenden Inhibitoren dieses Enzymsystems sind. Kinetische Studien ergaben, daß 4-Androsten-3,17-dion und Progesteron die Dehydrogenierung von DHEA nicht-kompetitiv hemmen, während Pregnenolon kompetitive Hemmwirkung aufwies. Zusätzlich

konnte gezeigt werden, daß bei Kombination von zwei Hemmstoffen, gleichgültig ob beide nicht-kompetitiv wirken oder ob einer nicht-kompetitiv, der andere kompetitiv hemmend wirksam ist, der inhibitorische Effekt verstärkt wird.
Zwischen dem Gehalt an plazentarem Mikrosomenprotein und der Progesteronsyntheserate besteht nach Depp et al. 1973 (23) und Ryan et al. 1966 (81) ein linearer Zusammenhang. Hagemenas et al. 1974 (34) postulierten auf Grund ihrer Untersuchungen an Rhesusaffenplazenten, daß die Biosynthese des Progesteron auf der Stufe des Stoffwechselschrittes von Cholesterol zu Pregnenolon vom Geschlecht des Föten beeinflußt wird.
Daneben rückte in den letzten Jahren die Rolle von Medikamenten immer mehr ins Blickfeld des Interesses. Juchau et al. 1974 (50) halten es für wahrscheinlich, daß Faktoren, die für die Verstoffwechslung von Pharmaka in der Plazenta eine Rolle spielen, auch am plazentaren Steroidstoffwechsel beteiligt sind. Eine besondere Rolle scheint dabei dem Cytochrom-P-450 zuzufallen.
Depp et al. 1973 (23) konnten zeigen, daß die Progesteronsynthese durch Cyanoketon, Östradiol und Oxymetholon gehemmt werden kann. Im ovariellen Gewebe von Ratten verminderte Phenobarbital nach Gupta et al. 1973 (32) die Umwandlung von Pregnenolon nach Progesteron hauptsächlich durch Hemmung der 3ß-ol-DHG, während die Δ^5-Isomerase weniger stark beeinflußt wurde.
Auch bei vorliegenden Untersuchungen mit Gewebe menschlicher, termingerechter Plazenten fand sich bei hohen Dosierungen von Clomiphen und Th 1165 a eine deutliche Hemmung der Progesteronsynthese aus Pregnenolon.
Zu gleichen Ergebnissen gelangte Weimer, A. 1977 (111) bei Verwendung von Cyproteronacetat und Allylöstrenol. Von früheren Untersuchungen über die Wirkung von Clomiphen sind die Arbeiten erwähnenswert, die sich

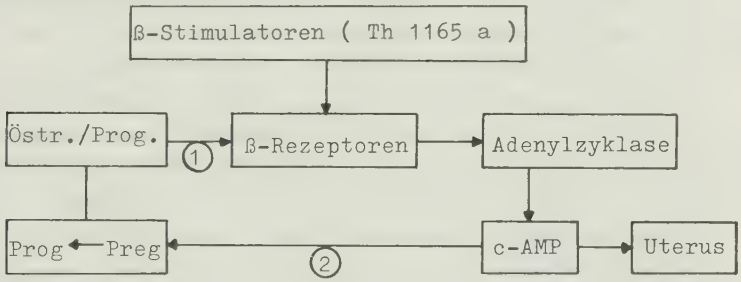
mit der direkten Beeinflussung von Enzymsystemen beschäftigen.
Schon 1963 vermuteten Smith at al. (90), daß Clomiphen direkt auf die Steroidgenese des Ovars einwirke, möglicherweise über eine Potenzierung der Wirkung der Gonadotropine, bei unveränderter Konzentration derselben.
Versuche bei denen Ovarien mit Clomiphen perfundiert wurden ergaben eine dreifach erhöhte Aromatisierung gegenüber den Kontrollwerten (20). Auch Adelung, K. 1976 (1) fand eine Steigerung der Aromatisierung durch Clomiphen bei seinen Untersuchungen mit menschlichem Plazentagewebe.
Hammerstein, J. 1969 (36), der sich sehr eingehend mit dem Wirkungsmechanismus von Clomiphen beschäftigte, bestätigte in seinen früheren Arbeiten, daß hohe Konzentrationen z.B. 1000ug Clomiphen pro 5 ml Inkubationsmedium die de Novo - Synthese von Progesteron aus markiertem Azetat vollständig suprimiert (36). In seinen Experimenten verwandte Hammerstein Corpora-Lutea Gewebe und untersuchte dabei die Bildung von Progesteron aus vorgegebenem Azetat.
Spätere von Hammerstein, J. durchgeführte Untersuchungen verdeutlichten, daß eine Steigerung oder Hemmung der Progesteronsynthese eine Frage der jeweils verwandten Konzentration ist. So ergab sich bei ihm im Bereich der Konzentration 10^{-10} und 10^{-8} molar jeweils eine Steigerung der Synthese, während schon bei der Molarität 10^{-4} eine deutliche Hemmung auftrat (37).
Bei seinen Versuchen fügte Hammerstein, J. dem Inkubationsmedium HCG zu und stellte dabei fest, daß es bei Fehlen von HCG zu keiner Stimulierung der Progesteronsynthese aus vorgegebenem Azetat kam. Er schlußfolgerte daraus, daß Clomiphen über eine bessere Utilisierung von HCG oder LH in den Ovarien wirke.

Die beiden Gipfel der festgestellten Stimulierung lagen wie schon weiter oben berichtet bei der Molarität 10^{-10} bzw. 10^{-8}, dabei entsprach der erste Peak dem nicht markierten Progesteron, das wie Hammerstein vermutet aus vorgebildetem Cholesterol stammt.
Bei weiterer Steigerung der Clomiphenkonzentration bis zur Molarität 10^{-8} verschwindet dieser Effekt und die de Novo - Synthese von Progesteron aus markiertem Azetat steigt an. Bei einer Konzentration von 10^{-4} sind beide Vorgänge dann gehemmt. Die von Hammerstein gefundenen Ergebnisse beweisen die schon 1963 von Smith et al. (90) geäußerten Vermutungen, daß Clomiphen über eine bessere Utilisierung von Gonadotropinen wirke.
Der Vergleich der in vorliegender Arbeit mit menschlichem Plazentagewebe gefundenen Ergebnisse mit denen Hammersteins, er verwandte Corpora-Lutea Gewebe, zeigt, daß die Wirkung von Clomiphen tatsächlich eine Konzentrationsfrage ist. Bei hier durchgeführten Untersuchungen ergab sich eine maximale Stimulierung im Molaritätsbereich von 10^{-8} bis 10^{-5} (bei Hammerstein im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-8}).
Was die Unterdrückung der Progesteronsynthese angeht lagen unsere Ergebnisse in einem höheren Konzentrationsbereich als diejenigen Hammersteins. Wir stellten bei $5 \cdot 10^{-2}$ eine vollständige Suppression fest, während der Konzentrationsbereich der bei Hammerstein schon die Synthese von Progesteron unterdrückte (bei der Molarität 10^{-4}) bei uns noch Werte zeigte die im Kontrollbereich lagen.
Der in vorliegender Arbeit gefundene Konzentrationsbereich in dem Clomiphen stimuliert oder supprimiert stimmt in etwa mit demjenigen Hammersteins überein.
Es ließ sich jedoch mit diesen Untersuchungen zeigen,

daß Clomiphen die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron in der menschlichen Plazenta steigert, auch ohne Zugabe von HCG. Es ist also eine stimulierende Einflußnahme von Clomiphen auf das 3ß-ol-DHG-System in der menschlichen Plazenta ohne HCG-Abhängigkeit festzustellen. Die Vermutung, daß die Stimulierung der Syntheserate über eine Erhöhung des c-AMP Spiegels geschehe, konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden.
Die hemmende Beeinflussung hoher Konzentrationen kann nicht mit der weiter vorne aufgeführten Theorie von Wiener et al. (112) erklärt werden, da Clomiphen nicht die Anforderungen erfüllt, die an einen Hemmstoff der 3ß-ol-DHG gestellt werden.

Das Tokolytikum Th 1165 a zeigte wie Clomiphen in hoher Dosierung eine deutliche Hemmung der Umwandlungsrate, in niedriger Dosierung hingegen eine Stimulierung. Zwischen dem stimulierenden Effekt von Th 1165 a auf die Progesteronsynthese und der Wirkung als ß-adrenerger Substanz mit Ruhigstellung des Uterus könnte folgender Zusammenhang bestehen.
Nach Triner et al. (105) bewirken die ß-adrenergen Substanzen über eine Aktivierung der Adenylzyklase und anschließendem erhöhten c-AMP Spiegel eine Kontraktilitäts- und Tonusminderung des Uterus.
Nach Jung et al. 1972 (51) kann jedoch die Sensibilität der ß-Rezeptoren des Uterus durch das Verhältnis von Östrogenen zu Progesteron verändert werden. Eine Verkleinerung des Quotienten, d.h. eine Progesteronzunahme führt zu einer erhöhten Sensibilität der ß-Rezeptoren. Diese Wirkung des Progesterons würde dem von Mosler, K. H. 1969 (70) postulierten Langzeiteffekt des Progesterons entsprechen. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung beider Theorien könnte die Wirkung des Th 1165 a auf zweierlei Arten geschehen.

Erstens durch einen direkten Einfluß auf die ß-Rezeptoren mit anschließendem Anstieg des c-AMP. Zweitens über eine erhöhte Progesteronproduktion aus Pregnenolon und anschließender Sensibilisierung der ß-Rezeptoren.
Wenn man nun die Mitwirkung des c-AMP bei der erhöhten Progesteronproduktion in Rechnung stellen würde, obwohl unsere Versuche keinen Einfluß des c-AMP auf die Syntheserate ergaben (dies könnte jedoch Folge der schlechten Permeation in die Zelle oder des zu schnellen Abbaues sein) ergäbe sich ein geschlossener Wirkungskreis.



1) Änderung der Sensibilität der ß-Rezeptoren
2) evtl. doch vorhandener Einfluß auf die Progesteronsynthese.

Der Mitwirkung des c-AMP käme wohl in diesem Schema die entscheidende Rolle zu, je nachdem, ob nun c-AMP an der erhöhten Progesteronproduktion beteiligt ist oder nicht. Auf entsprechende Befunde der erhöhten Syntheserate durch c-AMP sei später hingewiesen.
Eine in dieser Frage sehr interessante Arbeit lieferte Kords, H. 1975 (54). Er bezweifelt, daß die Wirkung von Th 1165 a allein über eine Erhöhung des c-AMP erklärt werden könnte, obwohl er in seinen Versuchen auch eine Erhöhung des c-AMP nach Anwendung von Th 1165 a fand.

Offen bleibt nach wie vor der Mechanismus der Hemmwirkung von Th 1165 a auf die Progesteronbildung in höheren Konzentrationen. Es wäre hier jedoch denkbar, daß eventuell unspezifische Effekte eine Rolle spielen.
Nachdem der Zusammenhang zwischen Th 1165 a als ß-adrenerger Substanz und zyklischem 3',5'- AMP aufgezeigt worden ist (105), sei auf die Beziehung des zyklischen AMP mit dem Progesteronmetabolismus eingegangen.
Roberts et al. 1965 (77) konnten an Mitochondrienhomogenaten der Rattennebenniere nachweisen, daß 3',5'- zykl. - AMP die Umwandlung von exogenem Cholesterol in Pregnenolon deutlich steigert, während die Progesteronbildung nur schwach stimuliert wurde. Diese Effekte seien vielleicht durch eine direkte Wirkung des zykl.-AMP auf die Mitochondrienmembran oder auf bestimmte mitochondriale Enzyme zu erklären. Als weiterer Mechanismus wird die oben erläuterte Phosphorylaseaktivierung mit nachfolgendem NADPH-Anstieg in Betracht gezogen (40).
Ebenfalls stimulierende Wirkung auf die Progesteronsynthese fanden Marsh et al. 1966 (66) im Corpus-Luteum des Rindes. Die maximale Stimulation wurde bei einer Konzentration von 0,02 molar 3',5'- cAMP gefunden. Die Menge an zyklischem AMP, die zugeführt werden mußte, lag weit über der physiologischen Konzentration, was mit der geringen Permeationsfähigkeit durch Zellmembranen und der Inaktivierung des zyklischen AMP durch die Phosphodiesterase erklärt werden dürfte.
Außerdem zeigte sich, daß andere Nukleotide, wie 3'- AMP, 5'- AMP oder ATP, exogen zugeführt, keinen Einfluß auf die Progesteronsynthese im Sinne einer Stimulation ausübten. Aus Vergleichsuntersuchungen mit LH darf geschlossen werden, daß das zyklische AMP bei

der Transformierung der LH-Wirkung auf die Progesteronsynthese im Corpus-Luteum eine entscheidende Rolle spielt (75).
Eine eher hemmende Wirkung auf die Progesteronsynthese fanden dagegen Koritz et al. 1968 (55) in Homogenaten von Ratten- und Rindernebennieren. 3',5'- cAMP hemmte die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron in der Rattennebenniere. Diese Hemmung war allerdings durch NAD aufzuheben, woraus Koritz schloß, daß die Dehydrogenase leichter inaktiviert werden kann als die Isomerase. In Mitochondrienfraktionen der Nebenniere des Rindes wirkte die Zugabe von cAMP auf den Metabolismus von ^{14}C-Cholesterol sich so aus, daß eine Anhäufung im Pregnenolon-Pool gefunden wurde mit begleitender Abnahme im Pool der Pregnenolonabkömmlinge. Dieser hemmende Effekt des cAMP fand wiederum bei unphysiologisch hohen Dosen statt (55). An der menschlichen Plazenta konnte Bedwani et al. 1973 (8) nachweisen, daß bei Zusatz von cAMP mit Theophyllin die Progesteronbildung aus ^{3}H-Cholesterol gehemmt wird und zwar wahrscheinlich auf der Stufe von Pregnenolon nach Progesteron. Mit den zuletzt genannten Ergebnissen stehen die in unserer Arbeit gewonnenen durchaus in Einklang.
Auch wir fanden bei Konzentrationen von 10^{-4}, 10^{-8} und 10^{-10} molar des cAMP eine verminderte Progesteronsyntheserate. Allerdings beruhen die Ergebnisse nur auf einem Versuch, sodaß keine statistische Aussage gemacht werden kann. Daß nicht nur eine zufällige Hemmung der Progesteronsynthese bei Verwendung von cAMP stattfand, mag daran zu erkennen sein, daß die Syntheserate im Kontrollansatz und im Ansatz mit Clomiphen (10^{-8} molar) - bei dieser Konzentration hatten wir in den Hauptversuchen eine deutliche Stimulation - im Bereich der in den Hauptversuchen erzielten Ergebnisse lag.

1 ADELUNG, K.: Über den Einfluß von Clomiphencitrat und Cyproteronacetat auf das aromatisierende Enzymsystem der menschlichen Plazenta. Inauguraldissertation Tübingen 1976

2 AXELROD, L. R., GOLDZIEHER, J. W.: Metabolism of ^{14}C-Prog by components of normal human ovaries. Acta Endocrinologica 65, 707 - 711 (1970)

3 BAILLIE, A. H., CAMERON, E. H. D., GRIFFITHS, K., HART, D. M.: 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in the adrenal gland and placenta. Journal of Endocr. 31, 227 - 233 (1965)

4 BAIRD, D. T., COCKBURN, F., GALBRAITH, A., KELLY, R., LIVINGSTONE, J. R. B., ROBINS, S. P.: Formation of progesterone and pregnenolone from ^{14}C-cholesterol by the intact midterm human foeto-placental unit perfused in vitro. Journal of Endocr. 49 XXXII (1971)

5 BARLAS, P., ADELUNG, K., RÖHNER, H., WEIMER, A., KELLER, E., SCHINDLER, A. E.: Die Wirkung von Medikamenten auf den Steroidstoffwechsel der normalen Plazenta. XX. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie Tübingen, 27. 02. - 01. 03. 1974

6 BAUMGARTEN, K.: Librium und Valium in der Schwangerschaft und unter der Geburt. Wiener Klin. Wochenschr. 75, 263 (1963)

7 BDOLAH, A., SCHRAMM, M.: The function of 3',5'-cAMP in enzyme secretion. Bioch. and Biophys. Res. Com. 18, 452-454 (1965)

8 BEDWANI, J. R.: Effects of hormones, prostaglandins and c-AMP on the synthesis of progesterone by the human placenta in vitro.
Journal Reproduction Fertility 34, 141 - 145
(1973)

9 BETTENDORF, G.: Die Ovulation, Physiologie und medikamentöse Auslösung.
Archiv für Gynäkologie 202, 132 - 159 (1965)

10 BETTENDORF, G., BRECKWOLDT, M., CZYGAN, P. J.:
Klin. experimentelle Untersuchungen mit Clomiphen
Geburtshilfe u. Frauenheilkunde 25, 673 - 694
(1965)

11 BETTENDORF, G., BRECKWOLDT, M., BORDASCH, C.:
Die Behandlung der Ovarialinsuffizienz mit Clomiphen.
Deutsche med. Wochenschrift 93, 995 - 1002
(1968)

12 BIRD, C. E., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.,
SOLOMON, S.: Metabolism of progesterone by the perfused previable human fetus.
J. of clin. Endocr. and Metab. 26, 1154 (1966)

13 BODEN, W.: Tokographische Untersuchungen über den Einfluß von Valium bei drohender Frühgeburt.
Relaxation und Sedation des menschlichen Uterus.
Bibl. Gynaec. 30, S. Karger, Basel 1964

14 BODEN, W., CRABBEN, H.v.d.: Wehenhemmung mit einer neuen beta-adrenergen Substanz.
Med. Welt 21/30 1342 - 1349 (1970)

15 BRUNNER, G.: Erfahrungen über Benzodiazepinderivate unter der Geburt. Relaxation und Sedation des menschlichen Uterus.
Bibl. Gynaec. 30, S. Karger, Basel 1964

16 BUCHELT, L., ROMMINGER, K. L.: Pharmakokinetik und Metabolismus von Th 1165 a beim Menschen.
Berotec-Symposium 1971, Int. J. clin. Pharmacol. Suppl. 4, 37 - 41 (1972)

17 BUDDECKE, E.: Grundriss der Biochemie
2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1971

18 CHARLES, D.: Clomiphene in the treatment of oligomenorrhoe and amenorrhoe.
Americ. J. Obstet. and Gynec. 86, 913 - 922 (1963)

19 COWAN, R. A., GILES, C. A., GRANT, J. K.: The intramitochondrial distribution of the 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Oxosteroid-Isomerase.
A probable Redistribution Artefact.
Journal of Steroid Bioch. 5, 607 - 608 (1974)

20 DAUME, E., STÄHLER, E., STURM, G.: Direct action of clomiphene on the human ovary perfused in vitro.
Journal of Steroid Bioch. Vol. 5, No. 4, 354, Abstract 244 (1974)

21 DAWSON, E. B.: Seasonal variation in adenosinetriphosphate and nicotinamide-adenosine-dinucleotide in normal term placenta.
Amer. J. of Obstet. and Gynec. 103, 141 - 143 (1969)

22 DELL'ACQUA, S., MANUSCO, S., BENAGIANO, G., VIQYIST, N., DICZFALUSY, E.: Androgen metabolism in the foetoplacental unit at midterm. 2nd Int. Congr. on Hormonal Steroids (Excerpta Medica Foundation, 1967)

23 DEPP, R., COX, D. W., PION, R. J., CONRAD, S. H., HEINRICHS, W. L.: Inhibition of the pregnenolone-3ß-hydroxysteroid-dehydrogenase-isomerase systems of human placenta and corpus luteum of pregnancy. Gynec. Invest. 4, 106 - 120 (1973)

24 DICZFALUSY, E.: Endocrine function of the human placenta. Acta Endocrinologica 34, Suppl. 50, 129 - 134 (1960)

26 DICZFALUSY, E.: A modified theory of steroid synthesis in the human foetoplacental unit. In Kracht: Endokrinologie der Entwicklung und Reifung. 16. Symposion der deutschen Gesellschaft für Endokrinologie 1970, 32 - 46, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1970)

25 DICZFALUSY, E.: Steroid metabolism in the human foetoplacental unit. Acta Endocrinologica 61, 649 - 664 (1969)

27 ENGELHARDT, A., TRAUNECKER, W.: Berotec, broncho-spasmolytische und kardiovaskuläre Wirkungen im Tierexperiment. Berotec-Symposion 1971, Int. J. clin. Pharmacol. Suppl. 4, 6 - 13 (1972)

28 FUCHS, F.: Treatment of threatened premature labour with alcohol.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 72, 1011 - 1014 (1965)

29 FUCHS, A. R., WAGNER, G.: The effects of ethyl-alcohol in the release of oxytocin in rabbits.
Acta Endocrinologica 41, 593 - 596 (1963)

30 GABBE, S. G., VILLEE, C. A.: Metabolism of pregnenolone by immature and term placental villi in organ culture.
Amer. J. of Obstet. and Gynaec. 110, 543 - 546 (1971)

31 GREENBLATT, R. B., BARFIELD, W. E., JUNGCK, E. C., RAY, A. W.: Induction of ovulation with MRL/41. Preliminary report.
J. Amer. med. Assoc. 178, 101 - 104 (1961)

32 GUPTA, C., KARAVOLAS, H. J.: Lowered ovarian conversion of ^{14}C-pregnenolone to progesterone and other metabolites during phenobarbital (PB). Block of PMS-induced ovulation in immature rats. Inhibition of 3ß-hydroxysteroid dehydrogenation.
Endocrinology 92, 117 - 124 (1973)

33 GUTERMAN, H. S.: Progesterone metabolism in the human female. Its significance in release to reproduction.
Recent Progr. Horm. Res. Vol. VIII, 293 - 331 (1953)

34 HAGEMENAS, F. C., KITTINGER, G. W.: The effect of fetal sex on placental biosynthesis of progesterone.
Endocrinology 94, 922 - 924 (1974)

35 HAMMERSTEIN, J.: Überstimulierung der Ovarien durch Clomiphen.
Arch. Gynäk. 204, 278 - 279 (1967)

36 HAMMERSTEIN, J.: Mode of action of clomiphene.
Acta Endocrinologica 60, 635 - 644 (1969)

37 HAMMERSTEIN, J.: Further evidence in favour of a direct effect of clomiphene citrate on ovarian steroidogenesis.
Fertility and Sterility ICS 278, 640 - 641 (1973)

38 HARBERT, G. M., McGAUGHEY, H. S., SCOGGIN, W. A., THORTON, W. N.: Concentration of progesterone in newborn and maternal circulations at delivery.
Obstet. Gynec 24, 413 - 426 (1964)

39 HARKNESS, R. A.: The effect of clomiphene on endocrine function in normal man.
J. of Endocr. 31, 53 - 61 (1964)

40 HAYNES, R. C., SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W.: The role of cyclic adenylic acid in hormone action.
Recent Progress in Horm. Res. XVI, 121 - 138 (1960)

41 HEINRICHS, H. D., ZANDER, J.: Die Ausscheidung hypophysärer Gonadotropine bei Frauen mit Störungen der Ovarialfunktion vor und während der Behandlung mit Clomiphen (MRL-41).
Klin. Wschr. 42, 15 - 21 (1964)

42 HELLIG, H., GATTEREAU, D., LEFEBRE, Y., BOLTE, E.: Steroid production from plasma cholesterol. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans.
J. of clin. Endocr. and Metab. 30, 624 - 631 (1970)

43 HÜTER, J.: Die Beeinflussung der Spontanaktivität des isolierten Rattenuterus durch Valium und seiner Lösungsvermittler.
Arch. Gynäk. 205, 59 (1967)

44 HÜTER, J.: Über die Wirksamkeit, Nebenwirkungen, Indikationen und Kontraindikationen von Diazepam (Valium) in der Geburtshilfe und Frauenheilkunde.
Klin. Wschr. 46, 68 - 71 (1968)

45 HÜTER, J., RIPPERT, CH., MEYER, C.: Wehenhemmung mit welchem Beta-Mimetikum? (Berotec, Ritodrine, Dilatol)
Geburtsh. u. Frauenheilk. 32, 97 - 103 (1972)

46 IGARASHI, M., IBUKI, Y., KUBO, H., KAMIOKA, J., YOKOTA, N., EBARA, Y., MATSUMOTO, S.: Mode and site of action of clomiphene.
Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 120 - 123 (1967)

47 JAFFE, R. B.: Biogenesis and metabolism of progesterone in the human fetus and placenta.
Clin. Obstet. Gynec. 10, 47 - 59 (1967)

48 JACOBSON, B. D.: Abortion: Its prediction and management. Use of progestins in patients with arborization of cervical mucus smears.
Fertil. Steril. 16, 604 - 612 (1965)

49 JAMA (Editorial communications): The second messenger.
Journal of the American Medical Association 206
1298 - 1299 (1968)

50 JUCHAU, M. R., SYMMS, K. G., ZACHARIAH, P. K.: Drug-metabolizing enzymes in the placenta.
Perinatal pharmacology problems and priorities.
Edited by J. Dancis and J. C. Hwang New York,
Raven Press 89 - 100 (1974)

51 JUNG, H., ABRAMOWSKI, P., KLÖCK, F. K., SCHWENZEL, W.: Zur Wirkung a- und ß-adrenergischer Substanzen am menschlichen Uterus und Nebenwirkungen auf Mutter und Kind.
in Jung, H.: Methoden der pharmakologischen Geburtserleichterung und Uterusrelaxation.
G. Thieme, Stuttgart 130 - 140 (1972)

52 KATO, Y., KOBAYASHI, T.: Effect of clomiphene on the uptake of estradiol by the anterior hypothalamus and hypophysis.
Endocrinology 82, 1049 - 1052 (1968)

53 KOIDE, S. S., TORRES, M. T.: Distribution of 3ß-ol-dehydrogenase and ^{5}-3-oxosteroid isomerase in homogenate fractions of human term placenta. Bioch. et Biophys. Acta 105, 115 - 120 (1965)

54 KORDS, H.: Wirkung von Fenoterol (Partusisten^{R}) auf die Motilität und den Gehalt des cyclischen Adenosin 3',5'-Monophosphat des isolierten Rattenuterus.
Z. Geburtsh. Perinat. 179, 40 - 44 (1975)

55 KORITZ, S. B., YUN, J., FERGUSON, J. J.: Inhibition of adrenal progesterone biosynthesis by 3',5'- cAMP.
Endocrinology 82, 620 - 622 (1968)

56a KÜNZEL, W., MESTWERDT, W.: Die Anwendung der Tokolytika während der Geburt.
Nieders. Ärzteblatt 22, 716 - 719 (1973)

56b KÜNZEL, W., REINECKE, J.: Der Einfluß von Th 1165 a auf die Gaspartialdrucke und auf kardiovaskuläre Parameter von Mutter und Fetus, zugleich eine quantitative Analyse der Wehentätigkeit.
Z. Geburtsh. u. Perinat. 177, 81 - 90 (1973)

57 LANG, N., BELLMANN, O., HINCKERS, H., HANSMANN, M. SCHLEBUSCH, H.: Einfluß der Tokolytika auf den Kohlenhydratstoffwechsel.
In J. W. Dudenhausen, E. Saling: Perinatale Medizin Bd. IV, G. Thieme, Stuttgart 366 - 372 (1973)

58 LAURITZEN, C., SCHAPER, H.: Ausscheidung von Progesteron sowie Progesteron-20a und -20ß im Harn von Neugeborenen.
In Kracht: Endokrinologie der Entwicklung und Reifung. 16. Symposion d. dt. Ges. für Endokr. 70, 225 - 228

59 LEUSDEN VAN, H. A., THOMAS, C., TELEGDY, G., DICZFALUSY, E.: Lack of squalene and lanosterol biosynthesis by the perfused human placenta at term.
J. of Steroid Biochem. 4, 349 - 354 (1973)

60 LITTLE, B., DI MARTINIS, J., NYHOLM, B.: The conversion of progesterone to 4-pregnene-20a-ol-3 one (20a-dihydroxyprogesterone) by human placenta in vitro.
Acta Endocrinologica 30, 530 - 538 (1959)

61 LOMMER, D., DORFMANN, R. J., FORCHIELLI, E.: Reversal of the 3ß-hydroxysteroiddehydrogenase-isomerase reactions in the rat adrenals.
Steroidologica 1, 175 - 182 (1970)

62 LORAINE, Y. A.; The effect of anti-ovulatory compounds on hormon excretion.
Int. J. of Fert. 9, 155 - 165 (1964)

63 LURIE, A. O., REID, D. E., VILLEE, C. A.: The role of the fetus and placenta in maintenance of plasma progesterone.
Am. J. Obstet. Gynec. 96, 670 - 675 (1966)

64 MAISS, CH., LEGERLOTZ, C.: Über die tokolytische Wirksamkeit der betaadrenergen Substanz Th 1165 a. Therapiewoche Heft 21, 1797 - 1805 (1972)

65 MAMOLI, L.: Bakterielle Dehydrierung von Pregnenolon zu Progesteron.
Berichte der dt. Chem. Ges. 71, 2701 - 2703 (1938)

66 MARSH, J. M., SAVARD, K.: The stimulation of progesterone synthesis in bovine corpora lutea by adenosine 3',5'- monophosphate.
Steroids 8, 133 - 148 (1966)

67 MARTHUR, R. S., ARCHER, D. F., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Quantitative assesment of the de novo sterol- and steroidsynthesis in the human foetoplacental unit.
Acta Endocrinologica 65, 663 - 674 (1970)

68 MATSUMOTO, K., YAMANE, G., ENDO, H., KOTOH, K., OHANO, K.: Conversion of pregnenolone to progesterone by rabbit placenta in vitro.
Acta Endocrinologica 61, 577 - 548 (1969)

69 MAYER, H. G. K.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die zentrale und periphere Wirksamkeit von Clomiphendihydrogencitrat.
Zeitschrift für Geburtsh. und Gynäkologie 174, 35 - 58 (1971)

70 MOSLER, K. H.: Probleme der Wehenhemmung durch Pharmaka.
Med. Klinik 64, 133 - 139 (1969)

71 MOSLER, K. H.: Potenzierung der Uterushemmung ß-adrenerger Sympathomimetika durch neue kardioprotektive Substanzen.
In Jung, H.: Methoden der pharmakologischen Geburtserleichterung und Uterusrelaxation.
G. Thieme, Stuttgart 170 - 177 (1972)

72 MOSLER, K. H., ROSENBOOM, H. G.: Neuere Möglichkeiten einer tokolytischen Behandlung in der Geburtshilfe.
Zeitschrift Geburtsh. und Perinatologie 176, 83 - 96 (1972)

73a PALMER, R., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on metabolism of C_{21}-steroids in the human foeto-placental unit.
Metabolism of pregnenolonesulfate by midterm placentas perfused in situ.
Acta Endocrinologica 52, 598 - 606 (1966)

73b PALMER, R., BLAIR, J. A., ERIKSON, G., DICZFALUSY, E.: Studies on the metabolism of C_{21}-steroids in the human foeto-placental unit.
Metabolism of progesterone and 20a- and 20ß-dihydroxyprogesterone by midterm placentas perfused in situ.
Acta Endocrinologica 53, 407 - 419 (1966)

74 PARTUSISTEN - BROSCHÜRE
Boehringer Ingelheim (1974)

75 RENSING, L.: Biologische Rhythmen und Regulationen.
Veb. Gustav Fischer Verlag Jena, 10 (1973)

76 RILEY, G. M., EVANS, T. N.: Effects of clomiphenecitrate on anovulatory ovarian function. Amer. J. Obstet. Gynec. 89, 97 - 110 (1964)

77 ROBERTS, S., CREANGE, J. E., YOUNG, P. L.: Stimulation of steroid transformations in adrenal mitochondria by cyclic 3',5'- adenosinephosphate.
Biochem. and Biophys. Res. Com. 20, 446 - 451 (1965)

78 ROBERTSON, D. M.: The measurement of oestradiol and progesterone in plasma from normal, infertile and clomiphene treated women.
Acta Endocr. (Kbh.) 68, 523 - 533 (1971)

79 ROMINGER, K. L., POLLMANN, W.: Vergleichende Pharmakokinetik von Fenoterol-Hydrobromid bei Ratte, Hund und Mensch.
Arzneimittelforschung (Drug Res.) 22, 1190 - 1196 (1972)

80 ROSNER, J. M., HALL, P. F., EIK-NES, K. B.: Conversion of Progesterone to pregnenolone by rabbit testes.
Steroids 5, 199 - 210 (1965)

81 RYAN, K. J., MEIGS, R., PETRO, Z.: The formation of progesterone by the human placenta.
Amer. J. Obstet. and Gynec 96, 676 - 682 (1966)

82 SCHINDLER, A. E.: Steroide im Fruchtwasser
Fortschritte der Geburtshilfe und Gynäkologie
46, 1 - 89 (1972)

83 SCHINDLER, A. E., SIITERI, P. K.: Isolation
and quantitation of steroids from normal human
amniotic fluid.
J. of clin. Endocr. and Metab. 28, 1189 -
1198 (1968)

84 SCHULZ, K. D.: Wirkungsmechanismus von Clomi-
phen im weiblichen Organismus.
Geburtsh. und Frauenheilk. 32, 483 - 492 (1972)

85 SCHUMACHER, E.: Über den Einfluß von Serotonin
auf den Stoffwechsel von Pregnenolon und
Progesteron in der menschlichen Plazenta.
Inauguraldissertation Tübingen 1975

86 SEIFART, K. H., HANSEL, W.: Some characteristics
and optimum incubation conditions of in vitro
progesterone synthesis by bovine corpora lutea.
Endocrinology 82, 232 - 240 (1968)

87 SINGH, E., KRISHNA, B.: Metabolism of preg-
nenolone by the human placenta.
Amer. J. of Obstet. and Gynec. 104, 605 - 606
(1969)

88 SIITERI, P. K.: The isolation of urinary
estrogens and determination of their specific
activities following the administration of
radioactive precursors to humans.
Steroids 2, 762 - 772 (1963)

89 SIITERI, P. K., TIPPIT, P., YATES, C., PORTER, J. G.: A double isotope procedure for the determination of progestins in rat ovarian vein blood.
Endocrinology 82, 837 - 843 (1968)

90 SMITH, O. W., SMITH, G. V.: In vivo Untersuchungen an Frauen über die Wirkung von Clomiphen auf die Stimulierung der Biosynthese von Östrogenen. (Action of MER-25 and of clomiphene on the human ovary)
J. Amer. med. Ass. 184, 878 - 886 (1963)

91 SOLOMON, S., FUCHS, F.: Progesterone and related neutral steroids.
In Fuchs, F., Klopper, A.: Endocrinology of pregnancy, Harper and Row, New York, Evansstone, London 66 - 100 (1971)

92 SOLOMON, S., BIRD, C. E., LING, W., SCRAMIYA, M., YOUNG, P. C. M.: Formation and metabolism of steroids in the fetus and placenta.
Recent Progress in Horm. Res. 23, 297 - 305 (1967)

93 STOCKHAUSEN, H., SCHNELL, J., RÜTHER, K.: Die Tokolyse unter der Geburt, eine tokographische Vergleichsuntersuchung bei Anwendung verschiedener tokolytischer Substanzen.
Geburtshilfe u. Frauenheilk. 32, 51 - 56 (1972)

94 STRELLER, I.: Zur Pharmakologie von Partusisten.
Vortrag auf dem Symposion über Th 1165 a
(Partusisten) bei der Behandlung in der
Geburtshilfe und Perinatologie.
Wiss. Leitung: H. Jung, Schloß Reisenburg,
06. - 07. Okt. 1973

95 STUDZINSKI, G. P., GRANT, J. K.: Effect of
adenosine-3',5'-phosphate on corticosteroid
production in vitro by slices of the adrenal
cortex of human beeings.
Nature (London) 193, 1075 - 1076 (1962)

96a SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W.: Formation of
adenosine-3',5'-phosphate and its relation to
the action of several neurohormones or hormones.
Acta Endocr. (Kbh.) 34, 171 - 174 (1960)

96b SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W.: The relation
of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase
to the actions of catecholamines and other
hormones.
Pharmacological Reviews 12, 265 - 299 (1960)

97 TAUBERT, H. D.: Zur Therapie mit ovulations-
auslösenden Substanzen.
Sitzg. d. Med. Ges. Frankfurt / M. 21. 06. 67

98 TAUSK, M.: Pharmakologie der Hormone
G. Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage 1973

99 TAYLOR, T., COUTTS, J. R. T., MACNAUGHTON, M. C.: Oestrogen formation in human foetuses perfused with ^{14}C-progesterone.
Acta Endocrinologica 75, 595 - 600 (1974)

100 TELEGDY, G.: Quantitative assessment of the principal steroids formed by human placentas perfused with labelled cholesterol in vitro.
Acta Endocrinologica 72, 127 - 136 (1973)

101 TELLER, W. M.: Besonderheiten des Steroidstoffwechsels beim menschlichen Feten und Neugeborenen. In Kracht: Endokrinologie der Entwicklung und Reifung.
16. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie 1970, 95 - 107, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1970)

102 THOMPSON, R. J., MELLINGER, R. C.: The effects of clomiphene citrate in patients with pituitary-gonadal disorders.
Amer. J. Obstet. Gynec 92, 412 - 420 (1965)

103 TOWNSEND, C., RYAN, K. J.: In vitro metabolism of pregnenolone-7a-^{3}H, progesterone-4-^{14}C and androstendione-4-^{14}C by rat tissue.
Endocrinology Philadelphia 87, 151 - 155 (1970)

104 TOWNSLEY, J. D.: Inhibition of placental 3ß-hydroxy-steroid dehydrogenase by naturally occuring steroids. A potential mechanism regulating oestrogen synthesis from unconjugated precursors.
Acta Endocrinologica 79, 740 - 748 (1975)

105 TRINER, L., OVERWEG, N. J. A., NAHAS, G. G.:
Cyclic 3',5'-AMP and uterine contractility.
Nature (London) 225, 282 - 283 (1970)

106 UNBEHAUN, V., CONRADT, A., MEISWINKEL, E.:
Aspekte der Therapie drohender Frühgeburten.
Med. Welt 23, 1920 - 1922 (1972)

107 UNBEHAUN, V., CONRADT, A., SCHLOTTER, C. M.,
FRIEDRICH, E., SCHINDLER, A. E., HELLER, S.,
WEBER, H.: Verhalten der radioimmunologisch
bestimmten Konzentrationen von Plasmaprogesteron
und -östriol, sowie von Serum-HPL während
Infusion von Th 1165 a.

108 WEIDINGER, H., WIEST, W.: Behandlung der vor-
zeitigen Wehentätigkeit mit einem neuen
Tokolytikum und Isoptin.
Fortschr. Med. 891389 - 1391 (1971)

109 WEIDINGER, H., MOHR, D.: Blutglukose und
immunoreaktives Insulin unter dem Einfluß von
Th 1165 a und Isoptin bei Schwangeren mit
oder ohne tokolytische Therapie.
Z. Geburtsh. u. Perinat. 177, 244 - 251 (1973)

110 WEIDINGER, H., WIEST, W., DIETZE, S., WITZEL, K.:
Die Auswirkung langzeitiger Wehenhemmung auf
das Neugeborene und den Säugling.
Z. Geburtsh. u. Perinat. 177 (1973)

111 WEIMER, A.: Über den Einfluss von Allylöstrenol und Cyproteronacetat auf das 3ß-ol-Dehydrogenase-Isomerase-System der menschlichen Plazenta. Inauguraldissertation Tübingen 1977

112 WIENER, M., ALLEN, H. G.: Inhibition of placental steroid synthesis by steroid metabolites. II: Inhibitior specificity Steroids 12:2, 261 - 273 (1968)

113 WIENER, M., FRIEDLANDER, R. L.: Abnormal progesterone synthesis in placental tissue from a spontaneous abortion. Amer. J. of Obstet. and Gynec. 111, 942 - 946 (1971)

114 YOUNGLAI, E. V., SOLOMON, S.: Neutral steroids in human pregnancy. In : Klopper , A., Diczfalusy, E.: Publications (Oxford, Edinburgh) 1969.

115 ZANDER, J.: Steroide im Plasma von menschlichem Plazentablut (Nabelschnurplasma) Acta Endocrinologica (Kbh.) 41, 507 - 520 (1962)

116 ZANDER, J.: Die Hormonbildung der Plazenta und ihre Bedeutung für die Frucht. Archiv für Gynäkologie 198, 113 - 127 (1963)

117 ZANDER, J., MÜNSTERMANN,v. A.: Weitere Untersuchungen über Progesteron in menschlichem Blut und Geweben. Klin. Wochenschr. 32, 894 (1954)

Dank

Der experimentelle Teil der vorgelegten Dissertation wurde im Steroidlabor der Universitätsfrauenklinik Tübingen durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof.Dr.A.E.Schindler für die Stellung des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und insbesondere für seine stete Bereitschaft theoretische und technische Probleme zu besprechen, die im Verlauf der Arbeit anfielen,

Herrn Dr.med.P.Barlas, Ass. an der Universitätsfrauenklinik Tübingen, für seine kollegiale Zusammenarbeit bei der praktischen Ausführung der Versuche,

Herrn Dr.med.E.Keller, Ass. an der Universitätsfrauenklinik Tübingen, für seine Anleitung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Ergebnisse,

Herrn Dipl.-Chem.Dr.Traut für bereitwillige Zurverfügungstellung von Geräten, sowie allen technischen Assistentinnen des Steroidlabors der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Beratung und Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 20. Juni 1947 wurde ich, Helmut Röhner, als Sohn des Hermann Röhner, Postbeamter, und der Martha Röhner, geborene Jäckle, Hausfrau, in Marschalkenzimmern geboren.
Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Marschalkenzimmern, danach wechselte ich auf das Progymnasium Dornhan über. Von 1961 bis 1963 besuchte ich das Progymnasium Sulz/Neckar. Da dieses Progymnasium nur bis zur Mittleren Reife reichte mußte ich für die Jahre 1963 bis 1966 das Gymnasium Horb/Neckar besuchen. Im Jahre 1966 legte ich dort die Reifeprüfung ab. Von 1967 bis 1968 war ich bei der Bundeswehr.
Im Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Tübingen. Im Sommersemester 1969 bestand ich das Vordiplom. Durch den plötzlichen Tod meines Vaters bedingt brach ich das Biologiestudium ab und wechselte über zur Theoretischen Medizin. Im Sommersemester 1971 bestand ich die naturwissenschaftliche, im Wintersemester 1972/73 die ärztliche Vorprüfung. In der Zeit vom 04. 03. 1976 bis 14. 07. 1976 legte ich das Staatsexamen ab.
Seit Oktober 1976 bin ich als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus Calw/Schwarzwald tätig.
Ab Juni 1973 führte ich den experimentellen Teil der vorgelegten Dissertation im Steroidlabor der Universitätsfrauenklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. E. Schindler durch.